

dc\_189\_11

**Akadémiai Doktori Értekezés**

**Iszkémiás károsodás csökkentése a mitokondriális funkció  
befolyásolása által**

**Dr. Lacza Zsombor**

**2011**

## Tartalomjegyzék

<b>Előszó.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Bevezetés és kutatási célok .....</b>	<b>14</b>
1.1. Mitokondriális ATP-függő kálium csatornák szerepe iszkémiában .....	14
1.2. Nitroztatív stressz és a mitokondriumok kapcsolata .....	15
1.2.1. Mitokondriális nitrogén monoxid (NO) termelés mechanizmusa.....	15
1.2.2. A nitroztatív stressz szerepe magas cukorszint által kiváltott stresszben .....	16
1.3. Sejtterápia szubcelluláris mechanizmusai .....	16
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>18</b>
2.1. Mitokondriális ATP-függő kálium csatornák szerepe iszkémiában .....	18
2.1.1. Alegység összetétel .....	18
2.1.2. Élettani szabályozás .....	19
2.1.3. Farmakológiai szabályozás .....	20
2.1.4. Az agyi diszfunkció és sejthalál mechanizmusai .....	23
2.1.5. Akut neuroprotekción a mitoK <sub>ATP</sub> csatorna aktiválása által .....	23
2.1.6. Protektív hatás újszülöttnél .....	25
2.1.7. Protektív hatás felnőttben.....	26
2.1.8. Korábbi kutatások korlátai.....	27
2.1.9. A mitoK <sub>ATP</sub> csatornák megnyílásának hatásai az organelum működésére.....	27
2.1.10. A mitoK <sub>ATP</sub> szerepe a késleltetett prekondícióban.....	29
2.1.11. Összefoglalás: a mitoK <sub>ATP</sub> csatornák jelentősége.....	29
2.2. A nitrogén monoxid (NO) termelés mechanizmusai mitokondriumokban .....	30
2.2.1. NO és nitrogén gyökök mérése fluoreszcens technikákkal .....	33
2.2.2. Gáz fázisú kemilumineszcencia .....	34
2.2.3. Hemoglobin és myoglobin oxidáció.....	34
2.2.4. Elektron spin rezonancia .....	35
2.2.5. Az arginin-citrullin konverziós esszé.....	35
2.2.6. Bakteriális párhuzamok.....	36
2.2.7. NOS enzimek a mitokondrium külső membránján.....	36
2.2.8. Nitrozótiolok mint NO forrás.....	37
2.2.9. Inorganikus nitrátok.....	38
2.2.10. Nem-enzimatis reakciók.....	38
2.2.11. Összefoglalás: a mitokondriális NO lehetséges forrásai.....	38
2.2.12. Mitokondriális NO-függő fehérje módosulások - mitoPARP aktivitás.....	40
2.2.13. S-nitroziláció és szerepe a sejt működésében.....	40
2.2.14. Nitrozótiolok szerepe cukorbetegség szövődményeinek kialakulásában .....	41
2.2.15. GSNO terápiás alkalmazásának lehetősége.....	43
2.2.16. Ismsert GSNO formulációk.....	44
2.3. Sejtterápia szubcelluláris mechanizmusai .....	45
2.3.1. A sejtterápia lehetséges hatásmechanizmusai.....	46
2.3.2. Teljes vagy részleges sejtfúzió .....	46
2.3.3. Mitokondrium-transzfer.....	47
<b>3. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>49</b>
3.1. Mitokondrium izolálás .....	49
3.2. Sejttenyésztés.....	49
3.3. Konfokális fluoreszcens mikroszkópia .....	51
3.3.1. Izolált mitokondrium vizsgálatok.....	51

3.3.2. Izolált neuron és asztrocita vizsgálatok .....	51
3.3.3. Idősorok vizsgálata H9c2 sejteken .....	52
3.3.4. Mitokondriális transzfekció.....	52
3.5. Áramlási citometria .....	52
3.6. Elektronmikroszkópia .....	53
3.7. Western blot .....	53
3.8. Két-dimenziós gélelektroforézis .....	54
3.9. Tömegspektrometria .....	54
3.10. Proteomikai számítások .....	55
3.11. NOS enzimaktivitás mérése arginin-citrullin konverzió révén .....	55
3.12. PARP enzimaktivitás esszék.....	56
3.13. Ingadozó cukorszint modell.....	56
3.14. Szimulált iszkémia modell .....	57
3.15. A mitokondriális funkció gátlása sejtenyészetben .....	57
3.16. Humán szövetminták vétele terhességi cukorbetegségben .....	58
3.17. Mikrocirkuláció mérés patkány diabétesz modellben.....	58
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>59</b>
4.1. Mitokondriális ATP-függő kálium csatornák szerepe iszkémiában .....	59
4.1.1. $K_{ATP}$ csatorna alegységek azonosítása a mitokondriumok membránjában .....	59
4.1.2. Funkcionális mérések a $mitoK_{ATP}$ csatornákkal.....	62
4.1.3. Fajok közötti összehasonlítás .....	62
4.1.4. $mitoK_{ATP}$ alegységek szív mitokondriumokon.....	66
4.2. Mitokondriális nitrogén monoxid (NO) termelés mechanizmusa .....	70
4.2.5. Mit is mér pontosan a DAF-FM fluoreszcencia?.....	70
4.2.1. Termelnek-e a mitokondriumok mérhető NO-t? .....	72
4.2.2. Lehetséges, hogy a $mtNOS$ azonos az $eNOS$ -sal? .....	74
4.2.3. Lehetséges, hogy a $mtNOS$ azonos az $nNOS$ -sal?.....	74
4.2.4. Lehetséges, hogy a $mtNOS$ azonos az $iNOS$ -sal? .....	75
4.2.5. $mtNOS$ hiányának igazolása szívizom mitokondriumokban.....	79
4.2.6. $mtNOS$ hiányának igazolása agyban.....	79
4.2.7. A respirációs lánc szerepe a mitokondriális NO termelésben.....	82
4.2.8. A DLDH komplex aktiválása nitroztatív stressz által és a következményes PARP-jellegű aktivitás fokozódás.....	84
4.2.8. Mitokondriális és sejtmagi szabadgyökök termelés ingadozó cukorszintben.....	87
4.2.9. Nitroztatív stressz terhességi cukorbetegségben .....	89
4.2.10. Nitrogén-monoxid donorok szerepe diabéteszes láb szindrómában .....	91
4.2.11. Stabil, a gyógyászatban is alkalmazható GSNO formuláció fejlesztése.....	93
4.3. Sejtterápia szubcelluláris mechanizmusai .....	95
4.3.1. In vivo őssejt átültetés hideglézióban.....	95
4.3.1. A nitroztatív stressz gátlása növeli az átültetett sejtek túlélését .....	95
4.3.3. In vitro iszkémia és őssejt átültetés modell.....	98
4.3.4. Őssejtek hozzáadásának hatása OGD-n átesett kardiomioblasztokhoz .....	100
4.3.5. Sejt-sejt kapcsolatok vizsgálata.....	100
4.3.6. Mitokondriumok szerepe a megmentő folyamatban.....	101
<b>5. Diskusszió .....</b>	<b>105</b>
5.1. Mitokondriális ATP-függő kálium csatornák szerepe iszkémiában .....	105
5.2. Mitokondriális nitrogén monoxid (NO) termelés mechanizmusa .....	106
5.2.1. A mitokondriális NO termelés szerepe az organelum működésében .....	106
5.2.2. Mitokondriális NO termelés hipoxiában.....	107
5.2.3. Érvek a NOS jelenléte mellett a mitokondriumokban .....	108
5.2.4. Érvek a NOS jelenléte ellen a mitokondriumokban.....	110
5.2.5. A mitokondriális NO alternatív forrásai .....	111

5.2.6. Mitokondriális fehérje nitroziláció és PARP aktivitás.....	112
5.2.6. Nitroztatív stressz és a cukorbetegség szövődményeinek kialakulása.....	117
5.2.7. A nitrozóglutation, mint lehetséges gyógyszerformuláció.....	118
5.3. Sejterápia szubcelluláris mechanizmusai .....	119
5.3.1. Sejtközi kapcsolatok szerepe.....	119
5.3.2. Parakrin faktorok? .....	120
5.3.3. Sejtfúzió .....	121
5.3.4. Mitokondriumok szerepe a sejtek megmentésében.....	122
<b>6. Új tudományos eredmények és következtetések (tézisek) .....</b>	<b>123</b>
6.1. A mitokondriális ATP-függő K-csatornák alegység összetétele .....	123
6.2. NOS-enzim független mitokondriális NO termelés mechanizmusa.....	123
6.3. Mitokondriális fehérje nitráció és PARP aktivitás.....	123
6.4. Nitroztatív stressz és a cukorbetegség szövődményei .....	124
6.5. Mitokondriumok szerepe az iszkémiát követő sejterápiában.....	124
<b>7. Hivatkozások .....</b>	<b>126</b>
<b>8. Saját közlemények.....</b>	<b>154</b>
8.1. A dolgozatban szereplő közlemények .....	154
8.2. Egyéb közlemények.....	157
8.3. Szabadalmak.....	159
8.4. Könyvfejezetek .....	160
8.5. Magyar nyelvű közlemények.....	161
<b>9. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>162</b>



## Előszó

Az iszkémiás betegségek, kiemelten a stroke és a szívinfarktus a leggyakoribb halálokok közé tartoznak, patomechanizmusukról igen sok tudományos eredmény született. Az elmúlt 10 évben több más, degeneratív vagy metabolikus jellegű betegségről is kiderült, hogy mikroszintű iszkémiás károsodás áll a háttérben, ezáltal még a diabétesz kutatása is a hipoxia-iszkémia irányába fordult. Mindezen erőfeszítések ellenére eredményes oki terápia alig ismert, ezért új terápiás célpontok, új eljárások azonosítása a kutatások legfőbb mozgatórugója. A jelen dolgozatban bemutatom az eredményeit három, egymástól alapvetően különböző terápiás irány kutatásának, amelyek mindegyike az iszkémiás károsodás csökkentésére irányult. Akár az ioncsatornák, akár a szabadgyökök, akár a sejterápia volt a tudományos kutatásaim kiindulópontja, minden esetben a mitokondriumok működésének vizsgálatához vezettek az eredmények, ezért választottam a dolgozat vezérfonalául ezt a sejtalkotót.

Miért éppen ezeket a közleményeket válogattam össze a doktori dolgozatba? A PhD fokozat megszerzése után témát kellett váltanom: az agyi keringés vizsgálata hagyományos módon egyre kevesebb új tudományos eredményt ígért. Megtanultam a mitokondriumok izolálását és egy könnyűnek látszó, de 2001-ben nagyon feljövő témával kezdtem a kutatásokat: Western blot-ok segítségével azonosítani az agyi mitokondriális NO szintáz enzim mibenlétét. Akkoriban csak néhány cikk írta még le, hogy talán létezik egy mitokondriális NOS enzim variáns, amely viszont új gyógyszercélpont lehet, ezért annak felfedezése komoly versenyt és nagy lehetőséget ígért. A blotok viszont nem voltak egyszerűek, több volt bennük az aspecifikus csík, mint a megfelelő, ezért újabb antitestekkel, újabb, még tisztább preparátumokkal dolgoztam. Hogy meggyorsítsam a munkát, májból és szívből is elkezdtem az izolálásokat, amelyet később kiterjesztettem több fajra, így egér, patkány, malac és humán mintákkal is dolgoztam. Az alapjában szemikvantitatív Western blotok mellett elkezdtünk immunprecipitációt, radioaktív NOS-aktivitás mérést is végezni és végre összeállt az első anyag: egér máj mitokondriumokban alacsony

NOS aktivitást mértünk, amely hipoxia hatására duplájára emelkedett. Ez volt az első leírása annak, hogy a mtNOS bármilyen élettani folyamatban szerepet játszik, ez a cikk sok érdeklődést kapott, máig sokan idézik. A további kísérletek azonban nemigen tudtak továbblépni a korai eredményeken. Nem sikerült kimutatni az eNOS foszforilációját mitokondriumokban, nem sikerült transzport szekvenciákat azonosítani az ismert NOS fehérjéken, és NOS knockout egerekben is megvoltak ugyanazok a jelek. Más kutatócsoportok eközben hasonló módszerekkel ellentétes eredményre jutottak: a mtNOS-t a nNOS egyik variánsának azonosították, még meg is szekvenálták egy részét. Ez a kutatócsoport, elsősorban Cecilia Giulivi vezetésével erős lapokban sorra közölt hasonló eredményeket, konferenciákon azonban elterjedt a szóbeszéd, hogy a kísérleteiket nemigen lehet megismételni. Nekem sem sikerült. Illetve sikerült valami hasonló jelet generálni immár 8 különböző módszerrel, de összességében egyik sem volt meggyőző, ezért be kellett látnom, hogy az értelmezésünk elhamarkodott volt, mtNOS nem létezik a keresett formában. Az elkövetkező években sorra jelentek meg részletes eredeti közleményeim, majd később két összefoglaló is arról, hogy mtNOS nem létezik. Szerettem volna azt látni hogy van, de sajnos nincsen. A tudományban negatív eredményt meggyőzően igazolni még nehezebb, mint pozitívat, de idővel sikerült a csatát megnyerni. Más kutatócsoportok is az én hipotézisemet támogató eredményre jutottak, le is közzölték félreérthetetlenül. A fluoreszcens NO mérő módszerrel, amely szinte mindenki kezében erős mitokondriális jelet adott (Diaminofluoreszcein és rokon vegyületei) kimutattam, hogy nem NO-t, hanem  $N_2O_3$ -re érzékeny, amely kis NO koncentráció mellett, de erősen oxidatív környezetben jön létre: a mitokondrium éppen ilyen. A további kutatásaim során felfedeztünk egy mechanizmust, amely a légzési lánc részvételével elsősorban nitrozótiolok, például nitrozóglutation (GSNO) forrásból állít elő NO-t a mitokondriumokban. A tudományos világ érdeklődése azonban szeszélyes, ezt a pozitív eredményt hozó, klasszikusan kidolgozott cikket kevesebben idézik, mint azokat, amelyekben a mtNOS létezése ellen harcolok. Fő ellenlábasm, Dr. Giulivi sosem fogadta el, hogy amit mért, az valószínűleg hibás értelmezés volt, de véleménye a tudományos közvélekedésben egyre inkább magára maradt. A sors fintora, hogy amerikai professzori kinevezéséhez épp tőlem kértek referenciát a felettesei, amelyben

természetesen nem utalhattam évekig húzódó szembenállásunkra. Én ezzel a felfedezéssel kiszálltam a mitokondriális NO forrásának kutatásából és később inkább a NO hatásaira koncentráltam. A leginkább szükséges eszköz a további kutatásokhoz egy mitokondriumokra specifikus NO donor, lehetőleg nitrozóglutation (GSNO) lett volna. Ennek kifejlesztésére be is adtam egy hazai pályázatot. Amíg a pályázat a maga ütemében bírálat alatt volt, egy amerikai kollégámnak, Paul Brookes-nak épp ugyanez az ötlete támadt és meg is csinálta hamarosan - nem kellett várnia pályázatokra 1-2 millió forintért. Egy szabadalmat találtam, amit bejelentett rá, és amikor személyesen találkoztunk már tesztelte a mito-specifikus GSNO hatásait. Mire az én pályázatom forráshiány miatt elutasításra került, addigra ő kiderítette, hogy a mito-specifikus GSNO éppen ugyanúgy hat, mint a sima GSNO. Innentől fogva elsősorban a GSNO, mint endogén, nagy mennyiségben jelen lévő NO donor hatásaira koncentráltam, hiszen Dr. Brookes mérései alapján nem volt már értelme mitokondrium-specifikus fejlesztéseknek. Nehéz technikai megoldásokkal, de sikeresen azonosítottuk azokat a fehérjéket, amelyek GSNO hatására nitrálódnak a mitokondriumokban: ezek között kellett keresni az élettani hatásokért felelősöket. A részleges lista furcsa egyveleget mutatott, amelyekből egyetlen enzim tűnt ki: a dihidro-lipoamid-dehidrogenáz (DLDH), amely az urea-ciklus része. Azért volt érdekes, mert az enzimkomplex, amihez tartozik, ugyanúgy NADH-t használ szubsztrátként, mint a jól ismert poliADP-ribozil-polimeráz (PARP), amely a nitrozatív stressz egyik fő downstream enzime. Megvizsgáltuk a lehetőségét annak, hogy a DLDH megfelelő környezetben képes lehet-e PARP-jellegű enzimátikus működésre, és meglepődve tapasztaltuk, hogy mind mitokondriális lizátumban, mind rekombináns formában képes PAR termelésre. Ezzel a felfedezéssel eljutottunk odáig, hogy ugyan a mitokondriumokban nem sikerült NOS enzimet találni, de azonosítottunk két új mechanizmust is, amelyek egyike az energiatermelő oxidatív foszforiláció enzimrendszerének részvételével nitrozáló ágenseket hoz létre, egy másik mechanizmus pedig ennek hatására mitokondriális poli-ADP-ribozilációt. Így együttesen egy teljes, a sejtmaghoz hasonló biokémiai láncot azonosítottunk, amely kizárólag mitokondriális enzimeket tartalmaz. A további kutatások ennek potenciális terápiás kihasználására fókuszáltak. Először azt

kerestük, hogy cukorbetegségben, amelyről egyre inkább ismert hogy az alapvető perifériás elváltozások oxidatív stresszre vezethetők vissza, hol lehet tetten érni a nitrozilációt. Érdekes módon a mitokondriumok világától legmesszebb vezető úton tudtunk sikeres fejlesztés irányába lépni: noha amerikai kollégákkal azonosítottuk az ingadozó cukorszint oxidatív stresszt okozó hatását, Magyarországon pedig terhességi cukorbetegségben találtunk jó diagnosztikus lehetőséget a nitrozatív stressz markerekben, a GSNO, mint potenciális gyógyszercélpont, a diabéteszes láb szindrómában bizonyult sikeresnek. Az állatkísérletek sikere után a fő nehézséget az okozta, hogy egy laboratóriumban jól használható készítmény teljesen alkalmatlan gyógyászati környezetben: vizes oldatban a féléletideje mindössze 5,5 óra. A molekulától eltérni nem akartunk, mivel endogén anyag, metabolizmusa jól ismert, ezért mellékhatásokra nemigen kell számítani egy megfelelő formuláció esetén. Sok próbálkozás után végül három független utat is találtunk, amelyek révén stabil, lokálisan alkalmazható készítményt állítottunk elő, amelyet végül emberen (saját magunkon) ki is próbáltunk - szép vazodilatációt okozott, amely területileg igen lokalizált volt. A szabadalmakat egy svájci gyógyszercég vette meg, akik a klinikai fejlesztést és kipróbálást végzik, reméljük a kész termék sikeresen eljut majd a betegekhez. Amikor elkezdtem kergetni a hipotetikus mtNOS enzimet a fő mozgatórugó a szív és agyi iszkémia volt, de ahogy a fenti történetből látszik, egy komoly zsákutca után a továbblépés mégiscsak elvitt egy gyógyszerfejlesztésig, noha nem abban a formában ahogy elterveztem.

Minden kutató tudja, hogy egyszerre több kísérleti vonalat kell folytatni, mivel sohasem lehet tudni, melyik ág vezet sikerre és melyik lassul le technikai vagy más nehézségek miatt. A mtNOS kutatása közben ezért kapcsolódtam bele egy technikailag hasonló, de más elvi irányba, a mitokondriális ATP-függő kálium csatornáknak (mitoK<sub>ATP</sub>) kutatásába. Az ötlet egyszerűnek látszott: ha már úgyis csinálunk egy sor Western blotot NOS antitestekkel, csináljunk párhuzamosan K<sub>ATP</sub> alegység antitestekkel is. Akkoriban fedezték fel ugyanis, hogy az egyik ismert K<sub>ATP</sub> nyitó vegyület, a diazoxid, a mitokondriumokra specifikus, de ami fontosabb: képes megvédeni a szívmizmot az infarktus hatásaitól. A hatás igen jelentős volt: az elhalt terület csökkenése 30%-kal, a halálozási arány csökkenése 50%-ról közel nullára, stb. Munkatársaimmal hasonló eredményeket találtunk

agyanban is kísérleti állatokban, ezért nekiálltam a mitoK<sub>ATP</sub> azonosításának. Ahogy a NOS esetében, itt is hamar kiderült hogy a mitokondriumban minden máshogy van. Találtunk egyértelműen a mitokondriumokban dúsuló Kir alegység variánsokat, de a SUR alegység variánsok nagyon más molekulasúlynál szerepeltek. Proteomikai technikákat kellett bevetni, 2-dimenziós blotokat és immunprecipitációt végezni, az antitestek által felismert szekvenciák révén a lehetséges szekvencia-szakaszokat azonosítani, *in silico* mitokondriális transzport-tag-eket azonosítani, végül nem úsztuk meg a primer szekvenálást sem. A kutatás fontossága kiemelkedő volt, ugyanis a mitoK<sub>ATP</sub> csatorna egy ideális gyógyszer-célpont: a nagy gyógyszergyárak mindegyike fejlesztett értágító vagy antidiabetikus céllal a K<sub>ATP</sub>-n ható szereket, több szer pl. a Glibenklamid igen elterjedt gyógyszer ma is, ezért ha sikerül a célpontot azonosítani a gyógyszerfejlesztés eddigi tudása, tapasztalatai, és nem utolsósorban az elvetett vegyületek közötti keresés hamar talált volna egy szívinfarktus és stroke megelőző molekulát. Egy igazi új blockbuster-jelöltet, amelyre nagyon szüksége van már az iparágaknak. Saját kísérleteink azonban egyre inkább meggyőzték arról, hogy a mitoK<sub>ATP</sub> csatorna tévútnak bizonyult: ugyan valószínűleg tényleg jelen van a mitokondriumok belső membránjában, de mennyisége olyan alacsony, hogy számottevő hatása nincsen az organellum működésére. A K<sub>ATP</sub> nyitó vegyületek farmakológiai hatékonysága továbbra is meggyőző, de a hatásmechanizmust máshol kell keresni, könnyen lehet, hogy nem is egy csatorna van, illetve, hogy nem elsősorban K<sub>ATP</sub> jellegű. Az új blockbuster azóta is várat magára, pedig az élettani lehetőség megvan...

A harmadik irány, amelyet ugyanabban az időben, ugyanannak a célpontnak a vizsgálatára terveztem teljesen eltérő mechanizmusokat vizsgált. Agyi iszkémiában és traumában, amelyek egyaránt maradandó agykárosodást okoznak, sejtbeültetéssel terveztem javítani a szöveti funkciót. A sejtterápia egy szinttel magasabban helyezkedik el, mint a mitokondriumok: nem sejten belüli, hanem sejtek, szövetek közötti hatásokat vizsgálunk. Mégis, ahogy a későbbiekben kiderül a mitokondriumok ebben a mechanizmusban is kulcsszerepet játszanak. Az első nehézséget az okozta, hogy 2001 környékén a sejtterápiás kutatások még éppen csak elkezdődtek. Majd minden kutató más területről érkezett, voltak fejlődésbiológusok, immunológusok és patológusok is,

akik módszereket fejlesztettek, majd hasonló kutatásokat indítottak függetlenül attól, hogy milyen háttérrel indultak. Én először egy rágcsáló modellt dolgoztam ki agyi trauma és embrionális szöveti összejt beültetés irányába, majd ennek segítségével azonosítottuk, hogy a nitrozatív stressz gátlása jelentősen fokozza a beültetett összejtek túlélését. Mellékleteként megfigyeltük, hogy néhány sejt valószínűleg fúzionált: az átültetett sejtek jelölt magja mellett egy jelöletlen sejtmag is látható volt. Ez indított el abba az irányba, hogy nagy idő és térbeli felbontással, *in vitro* vizsgáljuk a sejterápiát. Kidolgoztunk egy módszert, amely a konfokális mikroszkóp asztalán, folyamatos monitorozás mellett képes megmutatni az iszkémiás sejthalál és összejt-hozzáadás folyamatát. A kísérleteket elsősorban a sejtfúzió vizsgálatára terveztük, de nem ez volt a leglényegesebb megfigyelésünk. Sikerült ugyan lefilmezni néhány valódi sejtfúziót károsodott és átültetett sejtek között, azonban ez nagyon ritka jelenség volt. Egy-egy fúzió nem volt képes magyarázatot adni arra, hogy miért van akár 30%-nyi kettősen jelölt sejt már egy nap után is. A kézenfekvő válasz az volt, hogy a hozzáadott sejteket jelölő festék aspecifikusan átoldódik a károsodott sejtekbe, ezzel a fúzió látszatát keltve. A részletes megfigyelések ezt viszont kizárták: a filmszerű felgyorsított felvételeken azt láttuk, hogy több sejt képes egymás közvetlen közelében megőrizni a saját festékét, míg más sejtek aktívan sejt-sejt kontaktusba lépnek és a festékek kicserélődnek. Aktív, sejtek által szabályozott folyamatról van tehát szó. De mi lehet ez? A szakirodalom kevés támpontot nyújtott. Mindössze 10 cikk foglalkozott sejtek közötti membrán transzporttal, amely az általunk megfigyelthez hasonlóan nanométeres vastagságú membránhidakon keresztül történik. Egy cikk leírta, hogy ezeken a nanotubulusokon mitokondriumok áramlanak, amelyet mi is megfigyeltünk. Egy másik közlemény pedig azt mutatta ki, hogy mitokondrium-irtott sejtek egészséges társaiktól képesek átvenni, transzportálni mitokondriumokat és ezzel visszaállítani az oxidatív sejtlegzést. Hipotézisünk tehát az volt, hogy az iszkémián átesett sejtek, amelyek 24 órán belül elhalnak, megmenekülhetnek azáltal, hogy egészséges sejtektől nanotubulusokon mitokondriumokat vesznek át. Elégé merész hipotézis volt, de hihető és főleg jól vizsgálható a saját fejlesztésű módszerekkel. A kísérletek részben igazolták a hipotézist, mivel kimutattuk, hogy jól respiráló mitokondriumok nélkül az összejt-beültetés szövetmentő hatása nem érvényesül,

de azt is igazoltuk, hogy ehhez nem szükséges a mitokondriumok átjutása egyik sejtből a másikba. Ezek a megfigyelések jelentős érdeklődést váltottak ki, az egyik cikkünk sokáig a folyóirat legtöbbet letöltött cikkei között volt, egy éven belül több review-ban is idézték és szakmai fórumokon vitatták meg a kollégák. A mechanizmus pontos felderítése még hátravan, de bízom benne hogy a mitokondriumokkal szerzett korábbi tapasztalatok, jók és rosszak egyaránt, segíteni fognak abban, hogy ez a kutatási irány is végül új terápiák kifejlesztéséhez vezessen.

A 10 éves munka során több ígéretes ötletéről bizonyosodott be, hogy vakvágánynak bizonyult, 3 esetben új kutatási módszereket kellett kifejleszteni, hogy egyáltalán továbbléphessünk, de végül a 3 megközelítésből a szabadgyökök esetében szabadalmazott gyógyszerformuláció fejlesztése nőtt ki a kutatási irányból, míg két esetben új klinikai protokollok kidolgozása van folyamatban. Utólag visszatekintve könnyen kiszámítható, hogy 15 eredeti tudományos közleményt felölelő új alapkutatási eredmény és 3 mérési módszer kifejlesztése kellett ahhoz, hogy egyetlen hasznosítható technológia jöjjön létre - és egyáltalán nem volt megjósolható, hogy melyik eredmény vezet majd ide, illetve, hogy milyen betegség lesz a célcsoportunk. A tanulság számomra inkább az volt, hogy minden kutatásnak úgy kell nekiállni, hogy egy lépéssel közelebb vigyen egy új terápia vagy diagnosztikum kifejlesztéséhez, és ha nyílik egy lehetőség akkor azon az úton kell végigmenni még akkor is, ha ez elvezet az eredeti érdeklődési területemről és kisebb tudományos újdonsággal szolgál. Noha tudományosan izgalmasabb egy új nitrogén monoxid szintáz enzim után kutatni, de a cukorbetegéken inkább egy jól használható nitrogén monoxid donor készítmény segíthet - amelynek kifejlesztéséhez fel kellett használni az alapkutatási tapasztalatokat is.

Az értekezésben igyekeztem a lényegét kiemelve összefoglalni a három párhuzamos kutatási irány eredményeit. A módszerek ismertetését tömören, lényegretörően fogalmaztam, a részletes adatok a közleményekben és a 4 módszertani cikkben illetve könyvfejezetben szerepelnek, amelyeket a dolgozathoz mellékeltem. Az eredmények ismertetésénél kiemeltem a közlemények legfontosabb megfigyeléseit, a redundáns méréseket, például ugyanazt az eredményt más fajokban vagy szövetekben kihagytam, hiszen ezek

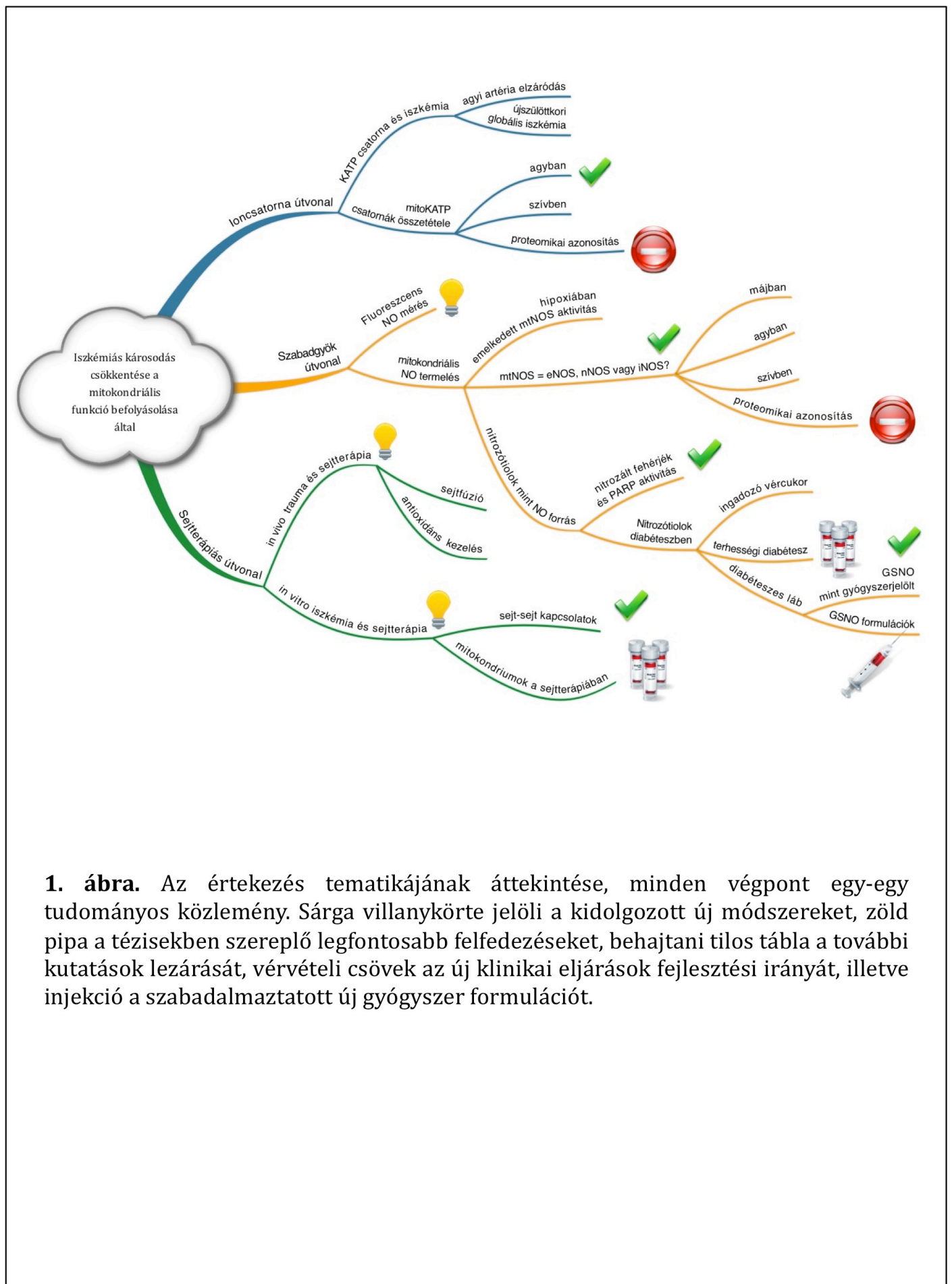
leginkább egymás kontrolljaiként szerepelnek és az eredeti közleményekben megtalálhatóak.

Budapest, 2011. augusztus 21.



Lacza Zsombor





**1. ábra.** Az értekezés tematikájának áttekintése, minden végpont egy-egy tudományos közlemény. Sárga villanykörte jelöli a kidolgozott új módszereket, zöld pipa a tézisekben szereplő legfontosabb felfedezéseket, behajtni tilos tábla a további kutatások lezárását, vérvételi csövek az új klinikai eljárások fejlesztési irányát, illetve injekció a szabadalmaztatott új gyógyszer formulációt.

## 1. Bevezetés és kutatási célok

### 1.1. Mitokondriális ATP-függő kálium csatornák szerepe iszkémiában

Az ATP szenzitív kálium csatornák ( $K_{ATP}$ ) a sejtek több pontján is megtalálhatóak, beleértve a plazma membránt és a belső mitokondriális membránt. (1). A kálium ion relatív koncentrációja jelentősen különböző a sejt közötti térben, a sejt plazmában illetve a mitokondriális mátrixban, ezért a  $K_{ATP}$  csatorna megnyílása lokalizációtól függően más hatást vált ki: a sejt felszíni csatornák megnyílása K kiáramlást és hiperpolarizációt, míg a  $mitoK_{ATP}$  csatornák nyitása K beáramlást és mátrix depolarizációt vált ki. A  $K_{ATP}$  csatornák gyógyszeres befolyásolása a különböző lokalizációkban fontos terápiás célként szolgál például diabétiszben (2, 3), hipertóniában (4), szívelégtelenségben (5) és szöveti iszkémiában (6). Izgalmas új felfedezés volt a  $mitoK_{ATP}$  csatornák szelektív nyitása, amely képes volt kivédeni az iszkémiás inzultus káros hatásait (7-13). Több tanulmány is foglalkozott azzal, hogy élettani vagy farmakológiai módszerekkel aktiválták a  $mitoK_{ATP}$  csatornákat, ezzel megvédve a szívet az iszkémiás stressztől (5, 9, 11, 13-15). A szív esetével ellentétben, viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre erről a mechanizmusról az agyban.

Néhány tudományos munka foglalkozott azzal, hogy az iszkémia reperfúzió és a  $mitoK_{ATP}$  csatornák közötti összefüggést vizsgálja a központi idegrendszerben (16, 17). Annak ellenére, hogy kézenfekvő lenne a szívben tapasztalt mechanizmusokat feltételezni az agy területén is, a rendelkezésre álló adatok ezt nem teljesen támasztják alá. Újabb kísérletek a kardiális területen is azt mutatták ki, hogy korábban a  $mitoK_{ATP}$  csatornáknak tulajdonított hatásért mégis a szarkolemmális csatornák a felelősek (15, 18). Jelenlegi ismereteink szerint két egyértelmű állítást támogat megfelelő tudományos bizonyíték: 1, A  $mitoK_{ATP}$  csatornák aktiválása által kiváltott neuroprotekciónak nemcsak rágcsálókban, hanem nagyobb emlősökben, így kutyákban és malacokban is működik, ezáltal feltételezhető, hogy van terápiás relevanciája emberben is. 2, A  $mitoK_{ATP}$  csatornák szelektív aktiválása új neuroprotektív mechanizmus, amely

független a glutamatergic receptoroktól illetve a szabadgyökök eliminálása révén létrejövő védőhatástól. Saját kísérleteink két kérdés megválaszolására törekedtek: 1, Milyen mértékű neuroprotekciónak érhető el farmakológiai mitoK<sub>ATP</sub> gátlás révén agyi iszkémiában? 2, Mi az a legység összetétele a mitoK<sub>ATP</sub> csatornáknak agyban illetve szívdobozban?

## 1.2. Nitrozatív stressz és a mitokondriumok kapcsolata

### 1.2.1. Mitokondriális nitrogén monoxid (NO) termelés mechanizmusa

A nitrogén monoxid (NO) elsősorban a citoplazmatikus NO szintáz (NOS) enzimek révén keletkezik az élő szövetekben, és feltételezhető, hogy a mitokondriumokban is található egy NOS enzim variáns. Legkorábban a mitokondriális membránok NADPH diaforáz aktivitását írták le, majd később több ismert NOS izoformáról is közöltek adatokat, miszerint kolokalizál a mitokondriumokkal (19). Sajnos épp a kulcsfontosságú mérések voltak nehezen reprodukálhatóak más laboratóriumokban, ezért két kutatócsoport, köztük a szerző is, megkérdőjelezte a mitokondriális NOS jelenlétét (20). Brookes összeállított egy kritikai összefoglalást a 2003-ig megjelent eredeti közleményekről a témában, és arra a következtetésre jutott, hogy sem a közlemények egyenként, sem összességükben nem szolgáltatnak elegendően erős bizonyítékot a hipotetikus mtNOS létezésére (21). Ettől függetlenül az is igaz, hogy sokféle mérési módszerrel, sokféle mitokondriális preparátumban mérhető erőteljes nitrogén monoxid-szerű aktivitás, amelynek előállítási mechanizmusa ismeretlen. A mitokondriális NO szintézis kérdése tehát kétféle bontható: 1, termelnek-e a mitokondriumok NO-t? és 2, Ha termelnek szignifikáns mennyiséget, akkor azt milyen biokémiai reakciók és enzimek révén?

A mitokondriális NO termelés mechanizmusának megismerése után a kézenfekvő következő kérdés, hogy milyen downstream mechanizmusokat aktivál a létrejött NO. Élettani vagy kórélettani folyamatokban játszik inkább szerepet? A hatása a mitokondriumra korlátozódik vagy kiterjed a sejt egészére? Ezen kérdések vizsgálata során elemeztük a mitokondriális fehérje nitrozilációt, illetve a következményes poli-ADP-ribozilációt, azaz PARP aktivitást.

### 1.2.2. A nitroztatív stressz szerepe magas cukorszint által kiváltott stresszben

Az endotél diszfunkció jelentős szerepet játszik a diabétesz perifériás mellékhatásainak patomechanizmusában, mint amilyen a retinopátia, mikroangiopátia vagy a cukorbeteg láb szindróma. Endoteliális diszfunkció esetén a vazokonstriktorok felé tolódik el az érfal simaizomzatára ható tényezők összessége, amely érszűkülethez, mikrocirkulációs zavarhoz és iszkémiához vezet. A fő vazodilatátor, a nitrogén monoxid hiánya és a paradox módon megnövekedett nitroztatív stressz együttese utal az NO-rendszer kóros működésére, amely az érhatásokon kívül még megnövekedett trombocita aggregációt is mutat. A diabéteszes mikroangiopátia kezelésében ezért kézenfekvőnek tűnik NO donorok alkalmazása. A nitroprusszid-nátrium (SNP) és szerves nitrátok gátolják a trombózis kialakulását, de tartós alkalmazásuk nitrát toleranciához és szisztémás mellékhatásokhoz vezet. Az S-nitrozótiolok (RSNO), mint például a nitrozóglutation (GSNO) jól ismert endogén NO raktározó és szállító vegyületek, amelyeket több farmakológiai kísérletben is felhasználtak, mint hatékony NO donorokat. A biztató kísérleti eredmények ellenére egyetlen nitrozótiol sem törzskönyvezett gyógyszer, amelynek fő oka az, hogy többségük igen bomlékony és stabil készítményt még nem sikerült belőlük kifejleszteni. Jelen kísérleteink arra irányultak, hogy 1, a cukorbetegséghez köthető perifériás elváltozásokban milyen szerepet játszik a NO, illetve 2, Lehetséges-e jól használható topikális NO donor készítményt kifejleszteni ezen szövődmények kezelésére.

### 1.3. Sejtterápia szubcelluláris mechanizmusai

Sokak szerint a sejt alapú terápiák fogják képviselni a következő áttörést a gyógyászatban. Több klinikai kísérlet is pozitív eredménnyel zárult, amelyek révén néhány szűk területen a sejtterápiák bekerültek az orvosi eszköztárba. Jelentős szövethiánnyal járó betegségekben azonban jelenleg még nincsen egyetlen olyan sejtes terápia sem, amely érdemi javulást tudna mutatni például szívinfarktusbán vagy strokeban. Ennek egyik fő oka az, hogy nem ismerjük

pontosan a beadott sejtek hatásmechanizmusát, ezért a protokollok optimalizálása, például a beadandó sejtek típusa, mennyisége, időpontja nem becsülhető meg. A hatásmechanizmus sejtek esetén mindenképpen bonyolultabb, mint hagyományos gyógyszerek esetében. Parakrin faktorok, amelyeket a sejtek termelnek, sejtfúzió a graft és a host között, de-differenciáció és transz-differenciáció egyaránt szerepet játszhat a hatásban, ráadásul időben és térben eltérő mértékben. Kísérleteink célja az volt, hogy a sejttérápia hatásmechanizmusait vizsgáljuk, ezen belül is elsősorban az iszkémia és nitroztatív stressz szerepét. Az *in vivo* állatkísérletekben az volt a fő kérdésünk, hogy az agyi lézió széli zónájába beültetett sejtek beépülnek-e a szövetbe, és a túlélésük javítható-e nitroztatív stressz csökkentő szerek alkalmazásával. A szubcelluláris mechanizmusok vizsgálatához át kellett térni jobban kontrollálható, nagyobb idő és térbeli felbontást lehetővé tevő *in vitro* módszerekre. Sejtenyészeteken azt vizsgáltuk, hogy egy iszkémiás inzultust követően a hozzáadott egészséges őssejtek hogyan lépnek kapcsolatba a sérült sejtekkel, illetve mi a mitokondriumok szerepe a folyamatban.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Mitokondriális ATP-függő kálium csatornák szerepe iszkémiában

#### 2.1.1. Alegység összetétel

ATP-szenzitív kálium csatornák jellemzően négy pórus-alkotó befelé rektifikáló kálium csatornákból (Kir) és négy modulációs szulfanilurea-szenzitív alegységből (SUR) állnak (2). Több Kir és SUR alegység szerkezete ismert, melyek közül a Kir 6.1. és a Kir 6.2, illetve a SUR-2 rendelkezik olyan transzport szekvenciákkal, amelyek valószínűsíthetően a mitokondriális membránok felé irányítják a fejrét. (22, 23). Ezen csatorna alegységek megfelelő sejten belüli elhelyezkedése az N-terminuson található transzport szekvenciáktól függ, illetve a megfelelő térbeli szerkezet létrejöttéhez molekuláris chaperonok, például a hősokk fehérjékhez tartozó HSP70 és HSP90 szükségesek (24-27). Ezen felül a C-terminálison elhelyezkedő felismerő szekvenciák biztosítják a 4 Kir és 4 Sur alegység összeépülését funkcionális mitoK<sub>ATP</sub> csatornává (28).

A Kir és SUR alegységek változatos expressziója lehetőséget nyit specifikus farmakológiai eszközök fejlesztésére, amelyek csak egy-egy meghatározott lokalizációjú csatornára hatnak. Például a Kir 6.1 és Kir 6.2 alegységek mRNS expressziója különbözik szívműködő és neuron tenyészetekben, és hipoxia hatására is eltérően reagálnak (29). Kimutatták azt is, hogy a Kir 6.1 alegység agyi mitokondriumokban dúsul, míg a szívműködő mitokondriumokban nem található meg (22, 30-32). Arra is van bizonyíték, hogy legalább egyféle sejt felszíni K<sub>ATP</sub> csatorna esetében, de valószínűleg a mitoK<sub>ATP</sub> csatorna vonatkozásában is a pórus-formáló Kir alegység neuronokban és asztrogliában különbözik (33). A SUR alegységekről még ennél is kevesebbet tudunk, de arra van adat, hogy SUR-2-höz hasonló fehérjék az agyi mitokondriumokban dúsulnak (32).

Annak fényében, hogy a mitoK<sub>ATP</sub> csatornák összetétele eltérő a különböző szövetekben, és a kutatási eredmények szerint többféle alegység variáns mutatható ki, elképzelhető olyan hatóanyagok fejlesztése, amelyek megfelelően

specifikusak az agyi  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornákra és ezzel új gyógyszerként szolgálnak a stroke megelőzésére (1, 32, 34). Jelen tudásunk szerint azonban még nem áll rendelkezésre elég adat ahhoz, hogy megfelelően specifikus hatóanyagokat lehessen fejleszteni, és a rendelkezésre álló szerek hatékonysága sem teljesen tisztázott.

### 2.1.2 Élettani szabályozás

A sejtfelszíni  $\text{K}_{\text{ATP}}$  és  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák funkciója meglehetősen eltérő, de a szabályozó mechanizmusaik hasonlóak. Például a sejtfelszíni  $\text{K}_{\text{ATP}}$  csatornák aktivációja a sejt hiperpolarizációjához vezet, míg a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák aktivációja depolarizálja az organelumokat (35, 36). Habár szinte mindegyik  $\text{K}_{\text{ATP}}$  csatornát aktiválni lehet GTP-vel és GDP-vel, mialatt az ATP vagy ADP gátolja azokat, a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák eltérően működnek: hosszú szénláncú CoA észterek gátolják a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornákat, de aktiválják a sejtfelszíni  $\text{K}_{\text{ATP}}$  csatornákat (2, 37-40), illetve mindkét csatornára hat a protein-kináz C (41). Kimutattuk ezen túl azt is, hogy a szuperoxid anion és a peroxinitrit aktiválja a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornákat (22). Munkacsoportunk korábbi kísérletei kimutatták, hogy iszkémia-reperfúzió során a sejtfelszíni  $\text{K}_{\text{ATP}}$  csatornák gátlódnak, ezért hasonló hatást várunk a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornáktól is (42, 43). Az oxigén szabadgyökök hatásának különbségeiben szerepe lehet az egyes csatornákat alkotó Kir és SUR alegységek közötti különbségeknek, illetve akár a szabadgyökök mennyiségének. Alacsony szabadgyök koncentráció aktiválhatja a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  csatornákat, míg magas szabadgyök tartalom, amelyet pl. iszkémia-reperfúzió esetében tapasztalunk, gátolhatja a csatornákat. Jelenlegi tudásunk alapján nehéz eldönteni, hogy a szuperoxid diszmutázok közvetlenül a szabadgyökök szintjének csökkentésén keresztül vagy protein kinázok aktiválása révén hatnak a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  csatornákra. Garlid és munkatársai (44) felvetették, hogy a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák aktiválása a mátrix lúgosítása és következményes szabadgyök termelés révén aktiválja a protein kinázokat, amelyek ezután a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  csatornák teljes megnyílásához vezetnek.

Lehetséges az is, hogy más, eddig ismeretlen faktorok modulálják a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornákat patofiziológiai körülmények között. Indirekt bizonyítékok utalnak

arra, hogy cukorbetegségben nemcsak a sejtfelszíni, hanem a mitoK<sub>ATP</sub> csatornák is károsodnak (45). A folyamatos szabadgyök termelés és protein kináz aktiváció mediálhatja a diabétesz-indukált K<sub>ATP</sub> csatorna diszfunkciót, de más mechanizmusok sem zárhatók ki egyelőre.

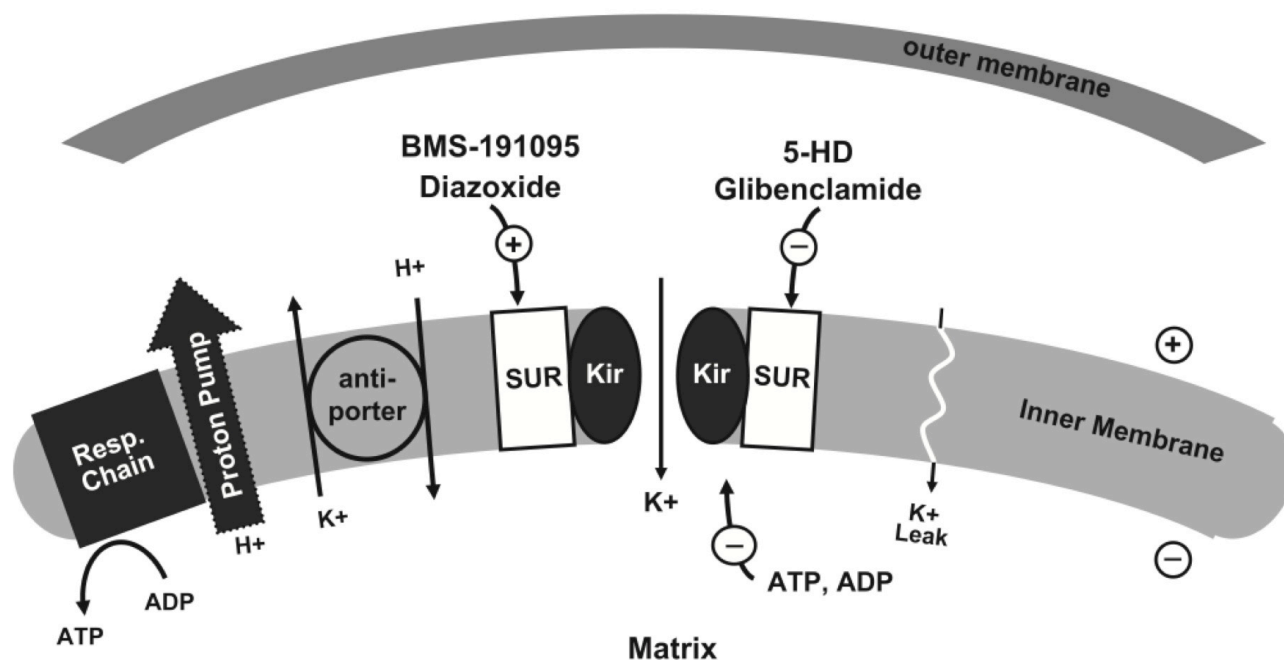
### 2.1.3 Farmakológiai szabályozás

A K<sub>ATP</sub> csatornák kísérletes vagy terápiás célú befolyásolásához megfelelően szelektív sejtfelszíni illetve mitokondriális K<sub>ATP</sub> csatornára ható szerek állnak rendelkezésre. A diazoxide és a cromakalim jól ismert K<sub>ATP</sub> aktivátorok. A diazoxide azonban nagyjából ezerszer hatékonyabb a mitoK<sub>ATP</sub> csatornákon a cromakalimnál több szövetben is, amely alól éppen az agy a kivétel, ahol ez a különbség nem olyan számottevő (46). Hasonlóképpen, a BMS 191095 szelektíven gátolja a mitoK<sub>ATP</sub> csatornákat a szívben (47), amely hatást agyban egyelőre kevésbé vizsgálták. A pinacidil egy másik ismert K<sub>ATP</sub> aktivátor, amely valamelyest szelektív a mitokondriumokra. Ezzel szemben az 5-hydroxydecanoate (5-HD) a mitoK<sub>ATP</sub> csatornákra nagyfokban szelektív gátlószer, míg a glibenclamide mind a mitoK<sub>ATP</sub> mind a sejtfelszíni K<sub>ATP</sub> csatornákon hat (1). Noha ez egyelőre nem bizonyított, a Kir és SUR alegységek nemrégiben felismert, szövetek közötti nagyfokú eltérése arra enged következtetni, hogy a hatóanyagok tekintetében is lehetnek szövetspecifikus ágensek, amelyek gyógyszerfejlesztés kiindulópontjainak számítanak (1, 22, 33). A mitoK<sub>ATP</sub> csatornák aktiválása mitokondriális depolarizációhoz vezet, amely némely esetben együtt jár a sejt szuperoxid szintjének emelkedésével is. A membránpotenciálra való hatások patch-clamp vagy potenciál-érzékeny festékek révén mért mértéke különbözhet az egyes szövetek között, ahogy kimutatták agy, szív és máj mitokondriumok esetében (1). A mitoK<sub>ATP</sub> aktiválószeresek membrán hatásai jól közzömbösíthetőek 5-HD-vel vagy glibenclamiddal, noha ezen antagonisták specificitása függ egyrészt a mitokondriumok állapotától, másrészt az aktiválószer beadása után eltelt időtől (44). MitoK<sub>ATP</sub> csatorna nyitó szerek adása esetében a sejtekben leírtak reaktív oxigén gyök szint emelkedést, de ennek molekuláris mechanizmusa egyelőre nem tisztázott. A diazoxid például



megemelheti a szuperoxid anion szintet a szukcinát dehidrogenáz gátlása révén vagy közvetlenül a mitokondriális belső membrán potenciáljának változtatása által. A 3-NPA, szukcinát dehidrogenáz specifikus gátlószere gyors és tartós oxigén gyök emelkedést vált ki neuronokban, amelyet csak részlegesen lehet 5-HD-vel blokkolni. Ezzel szemben a 3-NPA által kiváltott membrán depolarizáció gyors és átmeneti, amelyet az 5-HD teljes mértékben gátolni képes (48). Elképzelhető magyarázat, hogy a membrán depolarizáció 3-NPA esetében másodlagos a szukcinát dehidrogenáz gátlásának következtében, és egyaránt függ a protein kinázoktól és a mitoK<sub>ATP</sub> csatornáktól.

Újabb megfigyelések fontos különbségeket mutattak ki a diazoxid és a BMS-191095 hatásai között. Amíg a BMS-191095 csak kismértékben depolarizálja a mitokondriumokat a diazoxid hatásához képest, addig a ugyanez a vegyület nem vált ki szuperoxid termelést (49, 50). Noha mindkét vegyület aktiválja a protein kináz C-t, a diazoxide de nem a BMS-191095 aktiválni tudja az ERK2-t és a p38-at is. Ezen megfigyelések alapján azt feltételezzük, hogy a diazoxid mellett, hogy közvetlenül aktiválja a mitoK<sub>ATP</sub> csatornát, beleavatkozik a mitokondriális funkciókba a szukcinát dehidrogenáz gátlása révén is, ezért a hatásainak értelmezése nem minden esetben egyszerű.



**2. ábra.** A mitokondriális kálium háztartás mechanizmusa. A belső membrán jelentős koncentráció-különbséget tart fenn, a mitokondriális mátrixban jóval alacsonyabb a K szint mint a citoplazmában. Az energia-termelő protonpumpa ellenében dolgozó K<sup>+</sup>-antiporter távolítja el a mátrixból a K<sup>+</sup>-t, amely passzívan áramlik vissza (K<sup>+</sup>-leak), vagy aktívan, a mitoKATP csatornán keresztül. A mitoKATP csatornát nyitja a diazoxie és a BMS191095, míg gátolja az 5-HD és a glibenclamide.

#### 2.1.4. Az agyi diszfunkció és sejthalál mechanizmusai

Az agyi oxigén és glükóz ellátás megvonása neuronokban az  $ATP$  gyors depléciójához, membránpotenciál csökkenéshez, kalcium beáramláshoz illetve sejthalál kaszkádok elindításához vezet (51-55). A nekrosis közvetlen sejthalálra utal, amikor a sejtek visszafordíthatatlanul károsodnak és a fehérje szintézis szinte azonnal leáll. Az apoptózis későbbi, programozott sejthalált jelent, amelynek során aktív fehérje szintézis zajlik. A két kritikusan fontos, szinergista elem mindkét folyamatban a mitokondriumokba történő kalcium beáramlás és a mitokondriumok és más sejtalkotók által termelt nagy mennyiségű szuperoxid. A mitokondriális kalcium beáramlás a tranzíciór pórus (MTP) megnyílásához vezet, amelyen keresztül kilép a citokróm C és a mátrix elveszti integritását, megduzzad. A következményes szabadgyök termelés károsítja a sejt szinte minden alkotórészét, beleértve a  $K_{ATP}$  csatornákat és a  $Ca$  eltávolító mechanizmusokat. Az iszkémiás prekondíció egy látszólag paradoxikus folyamat, amelynek során egy erőteljes, potenciálisan halálos, de csak rövid ideig tartó iszkémiás epizód védelmet nyújt egy későbbi, erőteljesebb iszkémia hatásai ellen (18, 56). Ennek értelmében minden olyan inzultus, amely időben és mértékében korlátozott, de jelentős  $ATP$  depléciót, mitokondriális depolarizációt vagy szabadgyök termelést okoz, ki tudja védeni egy nagyobb noxa hatását (18, 55, 56). Mivel a prekondíció szinte minden szervben és fajban kimutatható, valószínűleg ez egy természetes védekező mechanizmus.

#### 2.1.5. Akut neuroprotekción a $mitoK_{ATP}$ csatorna aktiválása által

Amíg a szívben részletesen vizsgálták a  $mitoK_{ATP}$  csatorna szerepét (8, 15, 57), addig agyban kevés eredeti adat áll rendelkezésre (17, 30, 32, 36, 58-62). Ezek a korábbi kísérletek arra engednek következtetni, hogy a  $mitoK_{ATP}$  csatornák mind az akut, mind a késleltetett prekondícióban kulcsszerepet játszanak (8, 15, 57, 63). A szívizomban nyert eredményeket azonban nem lehet egyenesen átültetni az agyszövetre, hiszen nyilvánvaló funkcionális szöveti különbségek állnak fenn, mint például a vér-agy gát, a metabolikus aktivitásbeli különbség vagy az  $ATP$

termelés mechanizmusa, illetve vélhetően a mitoK<sub>ATP</sub> csatornák összetételében fennálló különbségek.

Az összes eddig publikált agyi kísérlet a mitoK<sub>ATP</sub> csatornákkal kapcsolatban azt mutatta ki, hogy a csatornák farmakológiai aktiválása megvédi az agyszövetet az iszkémiától. A kísérletek alapja az volt, hogy az állatokat vagy szöveteket előkezelték diazoxiddal közvetlenül iszkémia vagy anoxia előtt, majd megfigyelték, hogy ez az előkezelés több óráig védelmet nyújtott a káros hatások ellen. Ezt a hatást teljesen ki lehetett kapcsolni mitoK<sub>ATP</sub> csatorna gátlószerekkel, például 5-HD-vel vagy glibenklamiddal. További kísérletek kimutatták, hogy nemcsak az akut, hanem a késleltetett iszkémiás prekondícióban is szerepet játszanak a mitoK<sub>ATP</sub> csatornák, ahol napokkal az inzultus előtt kezelik a szöveteket és a mitoK<sub>ATP</sub> nyitó vegyület már nincs is jelen az inzultus bekövetkeztekor (22, 48-50).

Több tanulmány is kimutatta, hogy nem mitokondrium-specifikus K<sub>ATP</sub> nyitó vegyületek, például aprikalim is képes az agyi szövetekben iszkémiás védelmet biztosítani (64-66). Ezen kísérleteknek az értékelése nem könnyű, hiszen több lehetséges támadáspontja is van ezeknek a vegyületeknek és a pontos hatásmechanizmus sem ismert. Eddig még nem történt szisztematikus vizsgálat tekintetben, hogy milyen arányban járul hozzá a neuroprotekciónak a sejtfelszíni illetve mitokondriális K<sub>ATP</sub> csatorna. Újszülött malacokban például az aprikalim és a diazoxid azonos mértékben hatásos (58, 66), míg primér neuron tenyésztetben a diazoxid, és a BMS-191095 de nem a kromakalim a hatékony vegyület (50) and BMS191095 (49) (50). Az agyhoz hasonlóan a szívízomban is egymásnak ellentmondó eredmények születtek sejtfelszíni versus mitokondriális K<sub>ATP</sub> csatornák hatékonyságát illetően (18).

Két további eredmény érdemel figyelmet a témában. Mattson és munkatársai illetve (67) Reinhardt és munkatársai (68) azt találták, hogy az 5-HD egymagában képes védelmet nyújtani izolált neuronoknak illetve agyszövetnek iszkémia ellen. Meglátásuk szerint általános kalcium fluxus a mitokondrium membránokon keresztül elegendő lehet a neuroprotekciónak eléréséhez. Egyelőre ezen kísérletek megismétlése más laboratóriumokban még várat magára, ezért az értékelésük ma még nem lehet messzemenő, hiszen a kutatók többsége azt tapasztalta, hogy az 5-HD vagy a glibenklamid nem javítja a neuronális funkciót

sem szövettenyészetben sem pedig *in vivo* az agyban. Azt sem szabad elfelejteni, hogy a K-csatorna moduláló szerek hatása erősen függ a szövet aktuális állapotától, azaz hogy a beavatkozás idején a csatornák éppen nyitott vagy zárt állapotban vannak-e (44). Egy másik kísérletben azt találták, hogy a kalcium - aktivált kálium csatorna nyitása a mitokondriumokban megvédi a szívet az infarktustól. Ez a tanulmány erősíti azt a korábbi megfigyelést, amelyben ugyanaz a nyitószert, még pedig az NS1619, megvédte a malacok agyát a 10 perces globális iszkémia hatásaitól (66). Ezen eredmények értelmezése nehéz, mivel nincsen jól karakterizált nyitó vagy gátlószere a mitoKCa csatornának, ezért az NS1619 hatása lehet mitokondriális vagy sejtfelszíni is. Az eredmények értelmezését nehezíti, hogy Western blot technikával agyi mitokondriumokban nem lehetett kimutatni a KCa csatornák pórus formáló alegységét, de jelen voltak izolált agyi erekben. Mindennek ellenére a további kísérletektől, amelyek a mitoKCa csatornákra irányulnak még további eredményeket várhatunk.

#### 2.1.6 Protektív hatás újszülöttben

A legkorábbi cikkben, amely újszülött malacban alkalmazta a diazoxidot agyi iszkémia ellen 5-10  $\mu\text{M}$  lokális alkalmazása az agykérgen képes volt megőrizni a neuronális funkciókat 10 perces globális iszkémia után (58). Ebben a kísérletes modellben, amely tranziens agyi diszfunkcióhoz vezet, a diazoxid hatását 5-HD-vel lehetett gátolni. Az arteriolák vizualizációja az agy felszínén azt mutatta, hogy a diazoxidnak jelentős hatása van a nyugalmi értónusra is. Összehasonlításként a szívben 5  $\mu\text{M}$  diazoxide szignifikáns védelmet váltott ki, míg 30  $\mu\text{M}$  diazoxide kellett a maximális kardioprotekció eléréséhez (2, 40). A diazoxidéhoz hasonlóan más  $K_{\text{ATP}}$  csatorna nyitó szerek, például az aprikalim is kettős hatású, azaz az értónusra és az iszkémia ellen egyaránt hat (66), bár az intracellulár hatásmechanizmus nem ismert és az aprikalim jelentősen dilatálta az agyi arteriolákat. A diazoxid hasonlóképpen hatékony volt egy másik ismert újszülöttkori iszkémia modellben. Hét napos újszülött patkányok az egyik oldali a. carotis communis elzárása és 8%  $\text{O}_2$  belélegzés 2 ½ órán keresztül kiterjedt agyi károsodást okoz. Ezekben az állatokban 3.8 mg/kg diazoxide intraperitoneális adása 20%-kal csökkentette a lézió nagyságát, amely hasonló

mértékű volt, mint amit szuperoxid diszmutáz analógokkal lehetett elérni (30, 69). Ahogy a korábbi kísérletekben is kimutatták, a protektív hatást 5-HD alkalmazása meggátolta. Az állatok kis mérete miatt az agyi keringést ebben a modellben nem lehetett vizsgálni, de feltételezhetjük, hogy mindkét alkalmazott vegyület átjutott a vér-agy gáton.

#### 2.1.7. Protektív hatás felnőttben

Az újszülöttkorihoz hasonló hatásokat írtak több faj felnőtt egyedeiben is. Felnőtt patkányokból származó agyi szelet preparátumokon terminális hipoxiát okoztak, amelynek hatása ellen markánsan védett 300  $\mu\text{M}$  diazoxide alkalmazása, amelyet tolbutamiddal lehetett blokkolni (36). Ebben a kísérletben a diazoxid igen magas dózisát használták, amely vélhetően hatott a mitokondriális légzési láncra is, ezért a hatás értelmezése nem egyértelmű. Hasonlóképpen, 100-500  $\mu\text{M}$  diazoxide előkezelés dóziszfüggő mértékben védett a hipoxia hatásai ellen gerbil hippocampusban (70). Egy kutyában végzett hipotermiás szívmegállás modellben 2.5 mg/kg iv diazoxide csökkentette az agyi károsodást és neurológiai deficitet (16). Egérkísérletben az a. cerebri media elzárása által okozott infarktus mértékét 5 mg/kg diazoxide 50%-kal csökkentette, amely hatást az 5-HD vagy a glibenclamide meggátolt (17). Az egerekben az agyi keringés 40%-kal megemelkedett diazoxide hatására, amelyet 5-HD tovább emelt. A pontos jelentősége ennek a hatásnak nem ismert, de korábban kecskéken is kimutatták (71). Mivel azonban az agyi keringés mind a diazoxide kezelésre, mind annak gátlószerének jelenlétében kialakult, de az iszkémia ellen védő hatást csak a diazoxid tudta kiváltani, ezért a védőhatást nem lehet csak a keringésfokozás számlájára írni (32). A fenti állatkísérleteket kiegészítik neuron tenyészetben végzett kísérletek, amelyek szintén azt találták, hogy diazoxid alkalmazása a hipoxiás inzultus előtt megvédi a sejteket a későbbi károsodástól, és ez a hatás visszafordítható 5-HD vagy glibenclamide alkalmazásával (59, 61, 62).

A leírt kísérletek alapján a diazoxid hatékony szisztémás dózisa 2.5 - 5 mg/kg. Feltételezve, hogy a diazoxide egyenletesen oszlik el az agyszövetben, a végső koncentrációja 40  $\mu\text{M}$  körüli.

#### 2.1.8. Korábbi kutatások korlátai

Jelentős gátja az eddig végzett kísérletek értelmezésének, hogy szinte kizárólag egyetlen szer, a diazoxide mint feltételezett  $K_{ATP}$  csatorna nyitó szer farmakológiáján alapul, amelyet ugyan jól gátol az 5-HD és a glibenclamide, de ezen szerek farmakológiai támadáspontja szintén csak feltételezett. Ugyan több kísérlet kimutatta, hogy mindkét szer közvetlenül a mitokondriumokon hat, és affinitása kicsi a sejtfelszíni  $K_{ATP}$  csatornákon, magas dózisban a diazoxidénak nem-specifikus hatásai is lehetnek. A diazoxide 40  $\mu M$  feletti koncentrációban gátolja a szukcinát dehidrogenáz enzimet *ex vivo* és az is ismert, hogy éppen ennek az enzimnek a gátlása képes kiváltani iszkémiás prekondíciót. A mitokondriális légzés ilyen gátlásának védő hatása ugyan ismert, de a pontos biokémiai mechanizmus nem tisztázott. Izolált neuronokban azt találták, hogy 750  $\mu M$  diazoxide 25%-kal gátolja a szukcinát dehidrogenázt, amely nagyjából megfelel 500  $\mu M$  3-NPA hatásának (50, 60, 72). Hasonlóképpen, az 5-HD-ről leírták, hogy az acyl-CoA synthetase enzim átalakítja 5-HD-CoA-vá *ex vivo* (73), de ennek a módosulásnak sem a biológiai megléte, sem jelentősége nem ismert. Fentiek fényében nyilvánvaló, hogy a diazoxide és az 5-HD farmakológiai hatásainak molekuláris mechanizmusát nem lehet egyelőre teljes mértékben a  $mitoK_{ATP}$  csatornákkal azonosítani. Egy másik kémiai szerkezetű  $mitoK_{ATP}$  csatorna nyitó szert is felfedeztek, amelynek kardioprotektív hatását is kimutatták (47). Mindössze 30-40  $\mu M$  BMS191095 képes megvédeni az izolált neuronokat az OGD hatásától, amely összefügg a mitokondriumok depolarizációjával és protein kináz C aktivációval (49, 50). Ahogy a diazoxid esetében, úgy a BMS191095 esetében sem tisztázott még a pontos hatás a feltételezett  $mitoK_{ATP}$  csatornákon.

#### 2.1.9. A $mitoK_{ATP}$ csatornák megnyílásának hatásai az organelum működésére

A  $mitoK_{ATP}$  csatornák megnyílásának pontos mechanizmusa, tovagyűrűző hatásai máig nem ismertek, de több részleges magyarázatot is publikáltak (18, 44, 57, 67, 74).

A mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\Psi$ ) változása egyértelműen hat az organellum működésére, ezáltal a sejt teljes energia termelő rendszerére. A kálium bejutása részlegesen depolarizálja a membránt, amely gátolja vagy lassítja a Ca beáramlást, ezzel késleltetni tudja az apoptotikus mechanizmusok aktiválását (52, 54). Egy malac modellben végzett kutatás kimutatta, hogy a diazoxide alkalmazása a szívben csökkenti a mitokondriális Ca beáramlást (5). A mitoK<sub>ATP</sub> csatornák nyitása szívben 2-4 mV-tal, agyban 29 mV-tal csökkenti a membránpotenciált egyes mérések szerint (35, 74).

A mitoK<sub>ATP</sub> csatornák nyitásának másik ismert következménye az organellum ödémája, amely a fénytörés megváltozásával is jár. Diazoxide alkalmazása meggátolja a mitokondriumok volumenének növekedését, amelyet iszkémiás epizód után figyelhetünk meg, tehát a mitokondriumok struktúrájának megőrzése a mitoK<sub>ATP</sub> aktiválása által elegendő lehet az apoptotikus faktorok kijutásának megelőzésére (53, 100).

A mitokondriális citokró-m-C transzlokáció, amely pl. cianid vagy staurosporine hatására jön létre, kivédhető előzetes diazoxide alkalmazásával (17). Ugyanebben a közleményben azt találták, hogy egerekben a tartós a. cerebri media elzárásával létrehozott agyi lézióban a TUNEL festés erősödését meg lehetett előzni diazoxide alkalmazásával.

Korábban többen leírták, hogy asztroglia vagy neuron tenyészetben a diazoxide protein kináz C aktivációhoz vezet (49, 50). A pontos celluláris mechanizmus ugyan nem ismert, de azt kimutatták, hogy a protein kináz C aktiváció visszahatásként megnyújtja a mitoK<sub>ATP</sub> nyitást, ezzel pozitív visszacsatolást hozva létre és további fehérje, pl. BCL-2 foszforilációt indítva (44). A BCL-2 aktivációjáról pedig kimutatták, hogy sejtvédő hatással rendelkezik (75-77).

Diazoxide alkalmazása neuronokon vagy asztrocitákon gyakorlatilag azonnal megindítja a szuperoxid termelést (50). A termelődő szuperoxid mennyisége nem elég magas ahhoz, hogy a sejteken észrevehető morfológiai elváltozást vagy károsodást okozzon, de szerepet játszhat a diazoxide hatásának közvetítésében. A szuperoxid termelődésének helye nem ismert, de része lehet benne a diazoxide szukcinát-dehidrogenáz gátló hatásának, mivel ennek az enzimnek a gátlása 3-NPA-val szintén szuperoxid termelést indukál (48).



#### 2.1.10. A $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ szerepe a késleltetett prekondícióban

Az akut prekondicionálásban játszott szerepével szemben még kevesebbet tudunk a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornáknak a késleltetett prekondícióban játszott szerepéről. Szívben viszonylag jól körülírt hatásokat publikáltak (9, 78, 79), az agyban mindössze néhány közlemény jelent meg, azok is kizárólag patkány adatokat tartalmaztak (48). A késleltetett prekondíció napokkal később jelentkezik, egy jól meghatározható időablakban, amely arra utal, hogy specifikus új fehérjék termelése szükséges a hatás kiváltásához (18, 63, 72). Sem ezen fehérjék pontos mibenléte, sem pedig az ehhez vezető szubcelluláris mechanizmusok nem ismertek, mindössze annyi tudható, hogy  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  aktiváló szerek váltják ki a hatást, és  $\text{K}_{\text{ATP}}$  gátlók gátolják.

A késleltetett prekondíció alapvető elemei a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  nyitás, a protein kináz C aktiváció és a protein szintézis, amelyek végül a lézió által kiváltott szabadgyök termelés gátlásához vezetnek. A  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  nyitó diazoxide vagy BMS191095 tehát kimutatható szuperoxid szint csökkenésben (pontosabban a szintemelkedés elmaradásában) nyilvánul meg (6, 18, 49, 50). Az ok-okozati összefüggés felállításához azonban még kevés specifikus és mechanisztikus adat áll rendelkezésünkre. Bárhogyan is van, a szuperoxid termelés növekedése valószínűleg központi szerepet játszik a késleltetett iszkémiás prekondíció kiváltásában (50, 72, 80).

#### 2.1.11. Összefoglalás: a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ csatornák jelentősége

Az iszkémia által kiváltott sejthalál az egyik legjelentősebb halálok, ezért került a kutatások középpontjába az iszkémiás prekondíció, amely a legjelentősebb ismert szövetvédő mechanizmus. Gyakorlati alkalmazása azonban terápiás célra nem reális, hiszen nem lehetséges minden infarktus *előtt* egy megfelelően kontrollált kisebb léziót kiváltani védekezésépp. Mivel az iszkémiás prekondíciót a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák gátlása megakadályozza, illetve a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatornák nyitása prekondíciót vált ki noxa nélkül, ezért a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  csatorna egy kiváló gyógyszer-célpont lehet. Az eddigi tudományos bizonyítékok azonban elsősorban farmakológiai eszközökre, konkrétan a diazoxid és az 5-HD vélhetően specifikus hatásaira alapulnak, és a továbblépéshez, célzott terápiás

hatékonyságú mitoK<sub>ATP</sub> szerek fejlesztéséhez elengedhetetlen a mitoK<sub>ATP</sub> csatorna molekuláris szerkezetének ismerete. Az eredmények fejezetben ismertetett saját kutatások célpontja a mitoK<sub>ATP</sub> csatornák feltételezhető alegységeinek azonosítása volt.

## 2.2. A nitrogén monoxid (NO) termelés mechanizmusai mitokondriumokban

A nitrogén monoxid (NO) egy gázhalmazállapotú kismolekula, amelynek élettani jelentősége a XX. század végének egyik fontos felfedezése volt. Az NO nagy koncentrációjának toxikus hatása régóta ismert, az oxigénhez való hasonlatossága folytán elsősorban az oxigén kötő molekulák gátlása révén váltja ki a hatását. Élettani jelentőségének felismeréséhez kerülő úton, az endotél-függő relaxációs faktor (EDRF) felfedezésén keresztül vezetett az út. Furchgott vette észre még a hatvanas években, hogy az izolált erek kitágulnak fény hatására, amelynek mechanizmusát nem tudta megfejtetni (81, 82). Két évtizeddel később, ugyanilyen preparátumokon azt figyelte meg, hogy az endotél kiirtása az erek dilatációs képességének a csökkenéséhez vezet, amelyből azt a következtetést vonta le, hogy az endotél sejtek termelnek egy parakrin anyagot, az EDRF-et, amely az érfali simaizmot relaxálja (83, 84). Ignarro és Moncada munkacsoportjai voltak azok, akik először azonosították, hogy az EDRF valószínűleg azonos az NO-val, amelyet egy specifikus enzim, az NO szintáz (NOS) állít elő és a sejten belül a cGMP rendszeren keresztül hat (85-90). Az enzimátikus NO termelés mechanizmusa az arginine-citrulline konverzió, amelyet Ferid Murad kísérleteiből ismerünk (91, 92). A nitrogén monoxid termeléséért 3 később azonosított enzim a felelős, ezeket fő lokalizációjuk és funkciójuk alapján endoteliális (eNOS), neuronális (nNOS) és indukálható (iNOS) változatokban ismerjük, mindhárom enzim más-más gén terméke (91). Az EDRF és a fényre dilatáló erek kapcsolata is az NO-val függ össze, ezt a mechanizmust azonban csak jóval később sikerült felderíteni (lásd alább) (93-95). Annak fényében, hogy az NO milyen jelentős élettani funkciókkal bír, és hogy az egyik fő hatásterülete a mitokondrium, az esetleges mitokondriális eredetű nitrogén monoxid, illetve az NO termelés mechanizmusának felderítése igazi kihívás az alap kutatás számára. A sikeresen azonosított mitokondriális NO termelés viszont

épp alapvető szerepe miatt kiváló gyógyszer-célpontnak ígérkezik, ezért a kutatás másik mozgatórugója kellően specifikus célmolekula pl. enzim vagy transzporter azonosítása volt.

A szöveti NO termelés mechanizmusa jól ismert enzimátikus folyamat, amelynek vizsgálatára több kísérletes módszer is használható. Ezek a módszerek azonban, például az arginine-citrulline konverziós esszé, elsősorban az ismert NOS izoformák vizsgálatára vannak optimalizálva, amelyek a sejtplazma állományában működnek (96). A mitokondriális mátrix miliője annyira más jellegű, mint a sejtplazma, hogy a potenciális mitokondriális NO termelés vizsgálata igen nehéz, és valószínűleg ez az oka annak, hogy a mitokondriális NOS (mtNOS) felfedezése is igen késői a többi celluláris variánshoz képest (97, 98). A mitokondriális preparátumok mindig tartalmaznak egy kis mennyiségű (1-4%) kontaminációt sejtplazma és egyéb sejtalkotók formájában, amely olyan szövetekben, ahol magas a sejt NOS aktivitása, pl. agyszövet vagy erek esetében, jelentősen nehezíti az izolált mtNOS aktivitás kutatását (99).

Elméletileg igen nehéz elképzelni, hogy egy funkcionális NOS enzim működni képes a mitokondriális mátrix miliójében. Mivel a mitokondriális genom nem tartalmaz ilyen szekvenciát, egy NOS-jellegű enzimnek a sejtplazmából kell átjutnia a mitokondriális membránokon, majd megfelelő 3-dimenziós struktúrát felvéve a kofaktorokkal, azaz HEM-mel és flavinokkal kapcsolódva működésbe lépni. Igazolt algoritmusok segítségével mitokondriális transzport szignálokat kerestünk az ismert NOS izoformák szekvenciájában, sikertelenül (100). Ezen felül az is kétséges, hogy a megfelelő kofaktorok elegendő mennyiségben jelen vannak a mátrixban (21). Amennyiben azonban mégis jelen van egy mtNOS enzim, erős versenyben kell megszerezni a szubsztrátját, az arginint két jól ismert és magas koncentrációban jelen lévő mitokondriális enzimtől az argináztól és az arginin dekarboxiláztól (101, 102). Mindennek tetejében az argináz enzim termékéről, az agmatinról kimutatták, hogy gátolja a NOS enzimet, tehát összességében igen nehéz környezetben kell a hipotetikus mtNOS-nak működnie (101, 102)

Mindennek ellenére több kutatócsoport is leírta, hogy egyik vagy másik NOS izoforma jelen van és aktívan működik a mitokondriumokban. Több esetben az endoteliális variánst (eNOS) mutatták ki (103-105). Giulivi munkacsoportja az

indukálható NOS-t (iNOS) mutatta ki immunoreaktivitás alapján, bár később ugyanez a munkacsoport ugyanezt a jelet a neuronális izoformával azonosította (106, 107). Ahogy Brookes is felvetette egy kritikai összefoglalóban, ezek a publikációk minden esetben csak kivágott, szűk blotokat mutatnak be kontrollok nélkül, amely nehézkessé teszi az adatok értelmezését (21). Ahogy más esetekben is, itt is felmerül a preparátumok tisztaságának kérdése és az antitestek specificitása, amely egyáltalán nem tökéletes, és könnyen hamis pozitív eredményhez vezet. Például Giulivi munkacsoportja mind iNOS, mind nNOS antitesteket használt ugyanannak a 130 kDa nagyságú fehérjének a kimutatására, amelyet később az nNOS $\alpha$ -val azonosítottak protein mass fingerprinting alapján (106, 107). Saját kísérleteinkben szintén megtaláltuk ugyanezt a fehérjét ugyanezekkel az antitestekkel, de erősen kétséges, hogy nNOS $\alpha$  lenne, mivel változatlan mértékben jelen volt nNOS $\alpha$  knockout egerekben is (lásd az eredmények fejezetben).

Saját kísérleteinkben igyekeztünk kiterjedt pozitív és negatív kontroll méréseket használni. Minden esetben összehasonlítottuk a mitokondriális jelet az ugyanazon preparátum nyers szöveti lizátumával, és amennyiben a mitokondriális jel csak a szöveti jel néhány százalékát tette ki, akkor azt nem tekintettük specifikus jelnek - noha így lehetséges, hogy valós mtNOS mérést végül nem vettünk figyelembe. Igyekeztünk szubsztrát és kofaktor affinitás vagy immunprecipitáció segítségével erősíteni a mitokondriális jelet és egyben kiszűrni a nem-specifikus adatokat - technikailag sikeresen, ahogy azt a pozitív kontrollok mutatják.

A mitokondrium az elsődleges NO eltávolító mechanizmus a sejtekben, ezért minden NO, ami a mitokondriumokban termelődik valószínűleg el is nyelődik mielőtt kijutna a sejtplazmába (108). A külső forrásból érkező, tehát nem mitokondriális eredetű NO hatásai a mitokondriális membránokon és fehérjéken szintén jól ismertek, ezért a mtNOS kutatásakor azt is figyelembe kell venni, hogy a terméke erősen kompetícióban van a kívülről érkező NO-val a mitokondriális target fehérjékért (109-111) Nehezíti a kérdés vizsgálatát, hogy a mitokondrium igen kisméretű és kompakt organelum, amely a képalkotó módszerekkel való vizsgálatot befolyásolja, a mitokondriumok gyakorlatilag a fénymikroszkópos és áramlási citométeres lehetőségek határán helyezkednek el.

Annak érdekében, hogy a mtNOS esetében kapott eredményeket megfelelően tudjuk értelmezni, az egyes metodikák kritikai vizsgálata szükséges, elsősorban a mitokondrium preparátumok által támasztott technikai követelmények és tapasztalatok szempontjából.

### 2.2.1. NO és nitrogén gyökök mérése fluoreszcens technikákkal

Több fluoreszcens festéket is fejlesztettek, amelyek az NO mérésre alkalmasak biológiai mintákban. A legtöbbet használt és legjobban ismert szer a 4,5-diamino-fluorescein (DAF-2) és a 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM), mindkettő képes az NO-val reagálva erős zöld fluoreszcenciát mutató triazollá alakulni (112). Több kutatás is kimutatta, hogy a DAF-2 és a DAF-FM potencírozható szuperoxid ( $O_2^-$ ) vagy peroxinitrit ( $ONOO^-$ ) jelenlétében (100, 113, Jour'd'heuil, 2002, Free Radic Biol Med, 33, 676-84). Figyelembe véve, hogy *in vivo* körülmények között az NO mindig egyéb oxidánsokkal társul, azokkal együtt van jelen, különösen a mitokondriális mátrix területén, ezért biológiai mintákban a DAF fluoreszcenciát nem tekinthetjük specifikus NO jelnek, hanem inkább nitrozatív ágensek együttesének.

Mitokondriumok tekintetében a DAF fluoreszcencia szinte minden kutatócsoport vagy kísérleti modell esetében igen jól kimutatható, azaz a mitokondriumok erős DAF fluoreszcenciát mutatnak. Ezt a jelenséget először Lopez-Figueroa írta le, amelyet később többen megismételtek, confirmáltak (100, 114-117). Érdekes módon a mitokondriális DAF fluoreszcencia a saját méréseink alapján mindhárom NOS knockout törzsben jelen van, amely tovább erősíti azt a nézetet, hogy nem elsősorban NO, hanem egy nitráló közeg az, amely a DAF fluoreszcenciát kiváltja (100, 116). A mitokondriális NO metabolizmus kutatása szempontjából azonban a DAF fluoreszcencia igen jól használható eszköz, mivel folyamatos mérést tesz lehetővé akár sejtekben, akár izolált mitokondriumokon. Az a tény, hogy nem eléggé specifikus NO-ra a mitokondriumok esetében még jól is jön, hiszen a mátrixban a keletkező vagy bejutó NO hamar elreagál  $ONOO^-$  vagy  $N_2O_3$  irányába, és ezek együttes hatásának mérése alkalmas festék a DAF-2 vagy DAF-FM. Természetesen éppen ezért a DAF fluoreszcencia mérések önmagukban nehezen értelmezhetőek, ezért ki kell

egészíteni azokat pontosabb biokémiai specificitással rendelkező módszerek eredményeivel.

### 2.2.2. Gáz fázisú kemilumineszcencia

Az NO gázhalmazállapotú molekula, amely képes reagálni a szintén gázhalmazállapotú ózonnal, és ez a reakció egy kemilumineszcens jelet bocsájt ki. Ezzel a módszerrel már igen kis mennyiségű NO is kimutatható (< 1 parts per billion), amennyiben az gázfázisban található. Ezzel a módszerrel legjobban például a kilélegzett levegőben lehet NO-t mérni, és a szerző is sikeresen használta izolált mitokondriumok által generált NO mérésére - technikai értelemben sikeresen, hiszen csak a pozitív kontroll volt mérhető, a mitokondriumok nem (részletesen lásd az eredmények fejezetben) (116).

### 2.2.3. Hemoglobin és myoglobin oxidáció

A hemoglobin oxidáció egy indirekt esszé, amely alkalmas az NO mérésére amennyiben a körülményeket optimalizálni lehet atekintetben, hogy az NO-n kívül más oxidáns ne okozzon számottevő hemoglobin oxidációt, és a NOS hatását igazolni lehet gátlószer, például L-NAME alkalmazásával. Ezt a módszert több kutatócsoport is használta a mtNOS aktivitás meghatározására (18, 20, 118). Két munkacsoport, Boveris és Richter csoportjai pozitív eredményeket közöltek, amelyet azonban Tay és munkatársai nem tudtak reprodukálni. Ghafourifar egy reviewban felveti a problémát, miszerint a hemoglobin esszé nem képes mitokondriális NO termelést mérni, amennyiben a preparátumban extramitokondriális membrán elemek is jelen vannak (119). Ezt a nézetet erősíti, hogy sem a hemoglobin, sem a myoglobin nem képes átjutni a mitokondriális membránokon, ráadásul épp a mitokondriumok esetében a preparátum magas fényelnyelése miatt magas a háttér jel aránya egy ilyen optikai módszer esetén. A mitokondriális szuperoxid termelés, amelyet az előző fejezetben részletesen tárgyaltunk, szintén képes hamis pozitív mérésekkel szolgálni, tovább nehezítve ezzel a kapott eredmény értelmezését.

Hemoglobin oxidáció esszével a mitokondriális membránokban és szub-mitokondriális partikulumokban Boveris és munkacsoportja végez rendszeres

méréseket(118, 120, 121). Ezekben a kísérletekben szubsztrátot és kofaktorokat adnak a mitokondrium preparátumokhoz az arginin konverziós esszéhez hasonlóan. Ahogy más ilyen mérések esetében, itt is a fő kérdés a preparátum kontaminációja sejtmembrán elemekkel, amelyek magas NOS aktivitást mutatnak. Egy indirekt módszer ennek elemzésére az lehet, hogy a mitokondrium mérésekkel párhuzamosan ugyanazon preparátum sejt lizátumát is megmérjük, és ha a mitokondriális jelszint 10% körüli vagy az alatti a teljes szövethez képest, akkor az nem tartható specifikus mtNOS adatnak. Sajnos ezekben a publikációkban ilyen jellegű méréseket nem mutattak be. Később egy személyes találkozásunk alkalmával (egy közös pályázat keretében meglátogattam Boveris és Poderoso laboratóriumát) átbeszéltük ezen mérések hátulütőit. Az újabb kísérletekben Boveris munkacsoportja elsősorban olyan szélsőséges élettani helyzetekre fókuszál, ahol a mitokondriális NO termelés jelentősen emelkedik, ezért még kontamináció mellett is értelmezhető a nyert adat (122-127).

#### 2.2.4. Elektron spin rezonancia

Az elektron spin rezonancia technika igen érzékeny mérőeszköz, amellyel szabadgyököket lehet vizsgálni. Hotta és munkatársai elektron paramágneses rezonancia vizsgálatot végeztek, spin-csapdával hidroxil és NO gyököket mértek (105). Az esszé alsó méréshatárának közelében ki tudtak mutatni egy mitokondriális NO jelet, és arra következtettek, hogy az NO jel korrelál a szuperoxid termeléssel, amely lehet biológiai hatás is, de lehet a mérés aspecifikussága is.

#### 2.2.5. Az arginin-citrullin konverziós esszé

Az arginin-citrullin konverziós esszé a klasszikus NOS aktivitás mérésére alkalmas (128). Az oldatban magas koncentrációjú kofaktorok és szubsztrát jelenlétében, tehát csúcsra járattva a NOS enzimet, az enzim termékét, a citrullint határozzuk meg radioaktívan jelölt arginin segítségével. A szokásos negatív kontroll az L-NAME jelenlétében mért aktivitás, amely valószínűleg argináz eredetű. A mitokondriumok esetében a fő nehézséget az adja, hogy viszonylag

nagy mennyiségű szövet kell a méréshez, ezért pl. kis állatokból csak több minta poolozásával lehet érdemi méréseket produkálni, amelyek még így is közel esnek a méréshatárhoz. A másik fő probléma a mitokondriális arginin szubsztrátot használó enzimek magas koncentrációja, amely miatt a mitokondrium preparátumokban eleve jóval magasabb az esszé nem-specifikus aktivitása, mint sejt lizátumokban (100, 116, 129).

#### 2.2.6. Bakteriális párhuzamok

Jelen tudásunk szerint a mitokondriumok valószínűleg ősi baktériumok leszármazottai, ezért a bakteriális NOS enzimek nyújthatnak támpontot a mtNOS vizsgálatához. *Bacillus Subtilis*-ben mutattak ki működő NOS enzimet (130). Ez anNOS variáns szignifikánsan kisebb, mint az emlősökben található NOS, és csak az emlős NOS oxigenáz doménjével mutat homológiát. A bakteriális NOS HEM-et köt és az arginint citrullinná alakítja egy NO molekula termelése mellett. Ez az enzim ugyan nem tartalmaz saját reduktáz domént és az ahhoz kötődő flavinokat, ezért a mérésekben szükséges volt rekombináns NOS reduktázt adni a preparátumokhoz. Egy kicsit továbbgondolva ezt a vonalat, feltételezhető, hogy a mitokondriális NOS, ha szintén csak oxigenáz domént tartalmaz, akkor képes lehet az elektron transzport láncot felhasználni a reakció elektron donorjaként, tehát nincsen szüksége saját reduktázra. Ezen hipotézis vizsgálatára egyelőre nincs kísérletes adat.

#### 2.2.7. NOS enzimek a mitokondrium külső membránján

Az a felvetés, hogy ugyan a mitokondriális mátrixban nincsen NOS, de a külső membránhoz kötődik, sok problémára tud magyarázattal szolgálni. Elsőként megkerüli a transzport és kofaktor problémát, hiszen az enzim gyakorlatilag a citoplazma miliójében működik, de a mitokondriumhoz fizikailag kötve. Másodsorban ez a lehetőség képes magyarázatot adni az igen divergáló kísérleti eredményekre. Amennyiben a NOS a külső membránhoz dokkolódik, ez megtörténhet a mitokondrium izolálás közben akár műtermékként is. Óvatos homogenizálás és magas ionerősségű oldatokkal történő mosás jellemzően



eltávolítja a külső membránhoz kötött fehérjéket. Ezzel szemben olyan szövetben, ahol igen magas a sejtek NOS tartalma, a NOS hozzáköthet a mitokondriumokhoz izolálás közben is, ha erre megfelelő idő és fiziko-kémiai körülmények állnak rendelkezésre. Egy tudományos közlemény módszerek fejezete azonban nem ad kellő mélységű információt a cikk ilyen jellegű értékelésére, hiszen az izolálás finomságai már inkább a laboratóriumi rutinhoz tartoznak.

Az eNOS kötődése agyi mitokondriumokhoz Henrich és munkatársai leírásában jelent meg először (131). Ők mind fénymikroszkópos, mind elektronmikroszkópos technikákat alkalmaztak, és azt találták, hogy az enzim a juxtamitokondriális endoplazmás retikulumban található. Ezt a megfigyelést később mások is alátámasztották több független módszer segítségével endotél sejtekben (132). Gao és munkatársai egy 5 aminosavból álló szekvenciát azonosítottak az eNOS autoinhibíciós doménjében, amely a mitokondriális dokkolásért volt felelős. Mivel a neuronok és az endotél sejtek az NO legfőbb forrásai, a NOS feltételezett kapcsolata a mitokondrium membránokkal hasonló szerepet tölthet be, mint az enzimaktivitás szabályozásában a kaveolák (133, 134). Ezt a hipotézist erősíti, hogy NADPH diaforáz aktivitást mutattak ki mitokondriumok közelében (19). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy még abban az esetben is, ha a mtNOS enzim nincs jelen a mátrixban, a kívülről kapcsolódó NOS jelentős szabályozó szerepet játszhat az organelum működésében.

#### 2.2.8. Nitrozótiolok mint NO forrás

A mitokondriumok az NO elnyelési helyei, elsősorban azért, mert sok aktív tiol csoportot tartalmaznak. A fehérjék, de elsősorban a tripeptid glutation tiol csoportja reverzibilisen köti az NO-t és endogén NO donorként funkcionálnak. Mind nitrált fehérjék, mind nitrozóglutation (GSNO) jelen van a mitokondriumokban (135). A nitrozótiolok mint NO donorok funkcionális fontossága, szerepe egyelőre nem tisztázott, de mindenesetre számításba kell venni őket mint mitokondriális NO forrást.

### 2.2.9. Inorganikus nitrátok

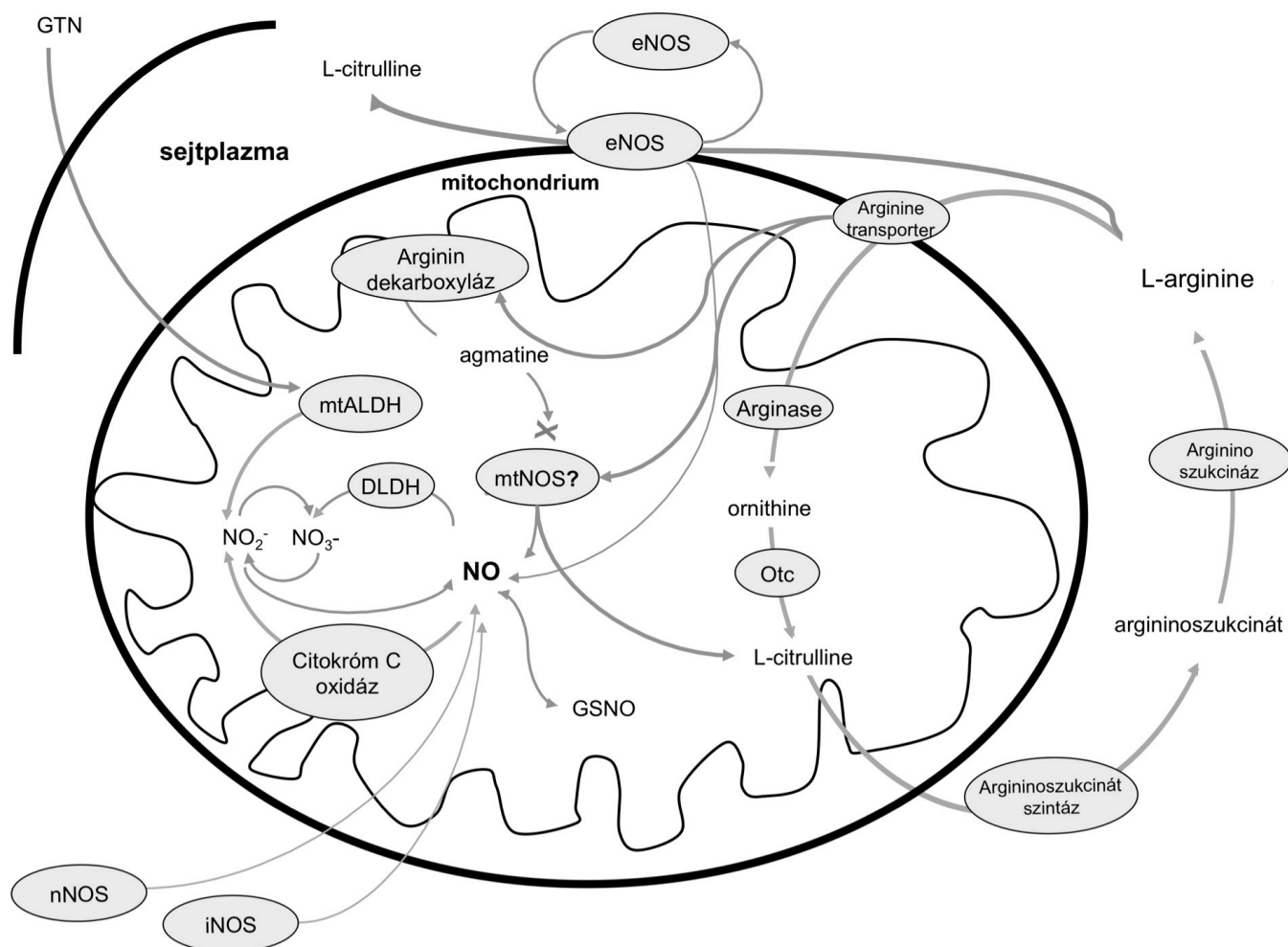
Inorganikus nitrát ionokat a mitokondriális légzési lánc NO-vá képes redukálni. Nohl és Kozlov kimutatta, hogy a bc<sub>1</sub> komplex a mitokondriális belső membránban a felelős ezért a konverzióért (136, 137). Ezek a kísérletek teljes oxigénhiányban történtek, amely körülmény nemigen figyelhető meg *in vivo*. Egy másik fontos és ide kapcsolódó eredmény azt mutatja, hogy a mitokondriális aldehid dehidrogenáz a felelős a nitroglicerinnel biológiai aktivitásának kialakításáért, és nitrit ion egy obligát intermediér a reakcióban (138). Noha a nitrit-nitrát metabolizmus nem feltétlenül kapcsolódik az NO metabolizmusához, ezek a kezdeti megfigyelések arra utalnak, hogy a mitokondrium kulcsszereplő ebben a folyamatban és további kutatásokról ezen a területen még érdekes meglátásokat várhatunk.

### 2.2.10. Nem-enzimatis reakciók

A hidrogén peroxid és az arginin reakciója révén NO keletkezést írtak le *in vitro* (139). Mivel mindkét reagens jelen van a mitokondriális mátrixban, elméletileg lehetséges, hogy ez a reakció a felelős a mitokondriális NO termelésért. Az *in vitro* kísérletekben magas, 10 mM körüli koncentrációban kellett napokig inkubálni a reagenseket, hogy kis mennyiségű NO keletkezzen, ezért a reakció biológiai szignifikanciája minden bizonnyal csekély.

### 2.2.11. Összefoglalás: a mitokondriális NO lehetséges forrásai

A fenti kísérleteket, módszerek kritikai elemzését összefoglalva elmondhatjuk, hogy legalább 3 független forrása van az NO-nak a mitokondriumokban: NOS enzimek a mitokondriumhoz kívülről kötődve, nitrát reduktáz aktivitása az elektron transzport rendszernek és nitrozótiolok mint NO donorok. Ezen felül kisebb mennyiségben további enzimrendszerek működése révén, sőt, non-enzimatis módon is keletkezhet NO, ezért a kérdés vizsgálata során az eredmények értelmezésekor ezen komplex szempontokat mindig figyelembe kell venni.



**3. ábra.** A mitokondriális nitrogén monoxid metabolizmus lehetséges útvonalai.

### 2.2.12. Mitokondriális NO-függő fehérje módosulások - mitoPARP aktivitás

A sejtmagban elhelyezkedő poli-(ADP-ribóz)-polimeráz enzim (PARP) oxidatív stressz során bekövetkező túlaktivációja mitokondriális diszfunkcióhoz és sejthalálhoz vezet (140, 141). A sejthalál mechanizmusa citokróm-c és apoptózisos-indukáló faktor (AIF) transzlokációval jár, amelynek során ezek a molekulák a mitokondriumból a sejtplazmába illetve a magba vándorolnak és kaszkád jellegű sejthalál mechanizmusokat indukálnak, beleértve a megnövekedett szabadgyök termelést (142). Több tanulmány is kimutatta, hogy a mitokondriális fehérjék (poli-ADP)-ribozilálódnak (PAR-álódnak), tehát feltételezhetően van a mitokondriális mátrixban egy biokémiai mechanizmus, amely PARP aktivitással rendelkezik (143, 144). Du és munkatársai kimutattak egy PARP-1 enzimet a primer agyi neuronokban és fibroblasztokban, míg mások ezen kísérleteket és ezzel a mitokondriális PARP enzim létét vitatják (142, 145). Annak ellenére, hogy több (ADP-ribozil) transzferáz szabad ADP-ribóz jelenléte is ismert a mitokondriumokban, igen kevés adat van arról, hogy mik a PAR akceptor fehérjéi illetve, hogy milyen enzimatis reakciók játszanak szerepet a mitokondriális PAR metabolizmusban, noha a sejtmagi párhuzamok alapján feltételezhető, hogy jelen van egy NO és nitroztív stressz által kiváltott PARP aktivitás fokozódás, amely végeredményben sejtkárosodáshoz vezet, de ennek a hipotézisnek jelenleg igen kevés kísérleti bizonyítéka ismert.

### 2.2.13. S-nitroziláció és szerepe a sejt működésében

A GSNO és más S-nitrozótiolok természetes úton keletkeznek és bomlanak a sejtekben, szövetközi térben, amelynek során NO-t raktároznak, szállítanak és felszabadítanak (146). A sejten belül a nitorzótiolok közvetlenül is képesek transz-nitrozálni más tiol csoportokat, azaz az NO csoportot egy másik fehérjére átvinni. Több mint 100 fehérjét azonosítottak, amelyek nitroziláltak, ezek többsége a mitokondriumban helyezkedik el valószínűleg azért, mert a glutation-függő formaldehid dehidrogenáz, más néven GSNO reduktáz a mitokondriumban található (147, 148). A GSNO a mitokondriumban is képes

keletkezni: vagy a citoplazmából érkezik a dikarboxilát vagy oxoglutarát transzporter rendszereken keresztül (135). Az S-nitrozilált fehérjék közül kiemelendő az elektron transzport lánc I és II komplexei, Krebs ciklus enzimek például az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz (KGDH) és dihidrolipoamid dehidrogenáz (DLDH). Az esetek többségében az S-nitroziláció gátolja az adott enzim működését. A mitokondriális fehérjék S-nitrozilációja vagy PAR-álódása a sejt számára fatális következményekkel járhat, elsősorban az energiatermelés gátlása és mitokondriális sejthalál kaszkádok aktiválása révén (148). A mitokondriális proteinek S-nitrozilációja GSNO vagy más NO donorok által jelentős funkcionális változásokhoz vezet, ezért várható, hogy több élettani vagy patofiziológiai mechanizmusban szerepet játszik (147, 149).

#### 2.2.14. Nitrozótiolok szerepe cukorbetegség szövődményeinek kialakulásában

A nitrogén monoxid és metabolizmusának kóros változása alapvető szerepet játszik a cukorbetegség több szövődményének, így a mikroangiopátiának, neuropátiának, diabéteszes láb szindrómának a kialakulásában. A jelen dolgozatnak nem központi témája a cukorbetegség részletekbe menő vizsgálata, amely messze vezet az iszkémia és a mitokondriális funkciók kapcsolatától, ezért csak röviden érintjük azokat a kísérleteket, amelyeket közvetlenül a mitokondriális oxidatív-nitrozatív stressz vizsgálatának folyamányaként végeztünk, és amelyek végül elvezettek egy gyógyszerformuláció kifejlesztéséhez

A szabadgyökök túltermelése az endotéliumban és a cukorbetegség más célszerveiben, például a retinában, vesében, szívben és a magas cukorszint között ok-okozati összefüggést mutattak ki (150-152). Az endoteliális diszfunkciót közvetlenül a magas cukorszint okozza, amely a következő kaszkádokat aktiválja: mitokondriális nitrozatív stressz, mitokondriális légzési lánc szétkapcsolás (153, 154), protein kináz c aktiváció (155), NAD(P)H oxidáz aktiváció (156), egyszálú DNS törés és PARP aktiváció (157), bazálmembrán megvastagodás és pro-apoptotikus fehérjék termelése (158). Mivel a sejten belül termelődő szabadgyökök szint emelkedés a fő kiváltó ok, ezért elképzelhető, hogy a cukorszint normalizálódása után is fennmarad a káros hatások bizonyos része

(150, 159). A jelen dolgozathoz kapcsolódó kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a magas cukorszint által kiváltott, de a cukorszint normalizálódása után is fennmaradó sejtkárosodásban milyen szerepet játszanak a mitokondriális oxidánsok.

Mivel ismert, hogy az oxidatív-nitrozatív stressz jelentős szerepet játszik a cukorbetegség szövődményeinek kialakulásában, és azt is kimutatták, hogy a normális terhesség alatt is megnő a szabadgyökök szintje, ezért feltételezhető, hogy a terhességi diabétesz és a szabadgyökök között is fennáll ez a kapcsolat (160, 161). A szülés kapcsán megemelkedő oxidáns szintnek szerepe lehet a fájások megindításában (162). A gesztációs diabétesz és a pre-eklampszia egyaránt emelkedett oxidáns szintekkel jár mind az anyai mind a magzati oldalon (például placentában, vérplazmában és köldökszínór szövetekben) (163-166). A szisztémás hiperglikémia hatására reaktív oxidén és nitrogén gyökök termelődnek, amelyek egyrészt nitrálják a fehérjéket (lásd fentebb) illetve DNS töréseket okoznak (167). A nagyfokú DNS károsodás viszont túlaktiválja a PARP enzimet, ezzel következményes sejthalált okoz a NADH teljes felhasználása és nekrozis indukálása által (168, 169). A jelen dolgozathoz kötődő kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a cukorbetegség terhességi formájában is kimutatható-e a magzati és anyai szövetekben a tirozin nitroziláció, illetve hogy a diétás vagy inzulinos kezelés hatására ez normalizálódik-e.

A cukorbetegség szövődményeinek kialakulásában az NO-nak paradox szerepe van: míg a vazodilatátor szerepű NO javarészt csökkent, azaz az endotél eredetű értágító hatás elmarad, viszont egyben megemelkedett a nitozáló ágensek mennyisége és a fehérjék nitráltsága fokozott (170). Olyan terápiás NO donorra van tehát szükség, amely elsősorban a vazodilatátor hatását maximalizálja az NO-nak, míg a káros nitráló, nitrozáló hatásokat nem fokozza. A GSNO-ról korábban kimutatták, hogy egészséges önkénteseken fokozza a bőr mikrocirkulációját, de a nitrozilációt nem vizsgálták (171). Cukorbetegben ismert, hogy a mikrocirkuláció nehezen vagy alig reagál nitrovazodilatátorokra, ezért az is alapvető fontosságú, hogy a tervezett NO donor molekula képes-e cukorbeteg szövetekben is a mikrocirkuláció fokozására anélkül, hogy a nitroglicerinnel tapasztalhatóhoz hasonlóan szisztémás kardiovaszkulár hatásai legyenek (170, 172).

### 2.2.15. GSNO terápiás alkalmazásának lehetősége

A GSNO, mint a mitokondriális NO egyik jelentős forrása, gyógyszeres terápia céljára is alkalmas lehet. Ahogy a bevezetőben is említettem, a kézenfekvő ötlet az lenne, ha a GSNO vagy más nitrozótiol mitokondrium-specifikus transzporttal rendelkezne, mivel így elméletileg nagyon szűk hatástartományt és következményesen kevés mellékhatást várunk. Egy ilyen molekula ismert, amelyet Brookes és munkatársai fejlesztettek, de a kísérletek során azt tapasztalták, hogy a mitokondriumba targetált GSNO hatásai nemigen különböznek a nem-targetált natív formáétól, azaz a GSNO eleve elsősorban a mitokondriális NO metabolizmusban játszik szerepet, még ha kívülről adagoljuk is (173). Ezért a terápiás felhasználás, fejlesztés célja a GSNO mint szisztémás vagy helyi kezelésben alkalmazható formuláció létrehozása lehet. Az alábbi táblázat teljeskörűen összefoglalja azokat a tudományos közleményeket, amelyekben GSNO-t embereken alkalmaztak bármilyen kísérletes vagy terápiás céllal.

#### 1. táblázat. GSNO humán alkalmazása.

Az alábbi cikkek egyikében sem találtak súlyos mellékhatást, és az egyáltalán jelentkező mellékhatások is a várható hemodinamikai hatásból voltak eredeztethetőek. A GSNO szub-hemodinamikai dózisa is hatékonyan képes gátolni a trombocita aggregációt, míg magasabb dózisok csökkentik a vérnyomást. A GSNO helyi alkalmazása nyálkahártyán vagy bőrfelületen lokális véráramlás fokozódást okoz, szisztémás mellékhatások nélkül, amely arra utal, hogy a GSNO helyben bomlik és az akutan felszabaduló NO okozza a tényleges hatást.

cit.	Beteg	Alkalmazás	Dózis	Várt hatás	Megjegyzés
(174)	koronária bypass n=24	centrális véna bólus	40 nmol/min a mellkas zárása közben	Trombocita aggregáció gátlás	
(175)	egészséges felnőtt n=5	iv	0.2, 1, és 5 nmol/min	értágulat	
(176)	egészséges	iv infúzió	1 pmol/min	értágulat az	Nitorvazodilatátor

	felnőtt		- 160 nmol/min	alkar artériáiban és vénáiban	k <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> összevetése
(177-179)	endarterektómia n=12	iv infúzió	2.2 vagy 4.4. nmol/kg/min műtét alatt és után 120 min.	csökkent embolizáció	A dózist a hipotenziós határ alá állították be
(180)	egészséges felnőtt n=4	iv	1 µmol	értágulat és hipotenzió	
(181)	pre-eklampsziás terhes n=10	iv infúzió	50-250 µg/min 60-90 percig	csökkent hipertenzió és trombózis hajlam	
(177)	endarterektómia, n=14	iv infúzió	2.2 vagy 4.4. nmol/kg/min 90 percig	csökkent embolizáció	A dózist a hipotenziós határ alá állították be
(178)	carotis angioplasztika, n=8	iv infúzió	2.2 vagy 4.4. nmol/kg/min 90 percig	csökkent embolizáció	A dózist a hipotenziós határ alá állították be
(182)	PTCA, n=6	intrakoronáriás infúzió	nincs adat	Trombocita aggregáció gátlás	Hemodinamikai változások nem voltak
(183)	fiatal felnőtt nő, n=10	iv infúzió	2.5 mg GSNO 30 perc alatt	Trombocita aggregáció gátlás	Hemodinamikai változások nem voltak
(171)	egészséges felnőtt, n=8	hidrogél, alkar bőrén	20 µl GSNO hidrogél 0.3 mol/g	emelkedett mikrocirkuláció a bőrben	Hemodinamikai változások nem voltak
(184)	cisztás fibrózis n=9	inhaláció	0.05 ml/kg, max. 3 ml 10 mM GSNO	növekedett oxigén szaturáció	A GSNO dózisa az élettani GSNO dózis tartományban volt
(185) <sup>47</sup>	instabil angina n=10 vagy miokardiális infarktus n=10	iv infúzió	2.2 vagy 4.4. nmol/kg/min 90 percig	Trombocita aggregáció gátlás	A dózist az artériás vérnyomásesés <10 mmHg szintjére állították be
(180)	egészséges felnőtt, n=12	iv bólus	0.5 umol	bal kamra funkció javulás	
(178)	carotis plakk, n=10	iv infúzió	4.4 mmol/kg/min 90 percig	csökkent embolizáció	kettős vak placebo kontrollált kísérlet

## 2.2.16. Ismert GSNO formulációk

A nitrozótiolok, köztük is elsősorban a legnagyobb koncentrációban jelen levő vegyület, a GSNO, igen gyorsan bomlanak vizes közegben, amelyet a hőmérséklet emelésével gyorsítani lehet. A GSNO bomlásának féleletideje vizes közegben 5,5 óra körül van, amely egyszerű oldatként alkalmatlan a klinikai



felhasználásra. Mindössze két szabadalom ismert, amelyek megpróbálták terápiás GSNO formulációt fejleszteni, inhalációs vagy orális alkalmazásra, de ezek egyike sem lett végül bevezetve a terápiába (WO 2007/076053A2, WO 2008/153762A2). Más megközelítésben a GSNO mint NO-donor film is alkalmas lehet helyi hatású tapaszként. Seabra és munkatársai egy hidrogél alapú GSNO gélt és filmet készítettek Pluronic™ F 127 felhasználásával, amely képes volt mellékhatások nélkül vazodilatációt létrehozni egészséges önkéntesek alkar bőr keringésében (171). Ez a formuláció ugyan PEG hozzáadásával tovább stabilizálható, azonban így is minden nap frissen kellett elkészíteni, ezért rutin klinikai felhasználásra szintén nem alkalmas.

A fotoszenzitizáció a nitrozótiolok érdekes tulajdonsága, amelyet esetleg ki lehet használni kontrollált NO donor készítmények fejlesztésére. Furchgott figyelte meg a 60-as években, hogy fény hatására az izolált erek dilatálnak, és a hatás a 320 és 450 nm hullámhosszakon a maximális (81, 82). Furchgott később Nobel-díjat kapott az endoteliális NO mint vazodilatátor felfedezéséért, de a korábbi, fény indukált dilatációs eredményei feledésbe mentek. Noha soha nem vizsgálták kísérletesen, de érdekes egyezés, hogy a fenti két hullámhossz megegyezik a nitrozótiolok fő UV elnyelési csúcsával (320 nm), és a GSNO másik, látható fénybeli elnyelési csúcsával, amely a molekula narancssárga színét adja (450 nm) (186). Több tanulmány is felvetette, hogy a GSNO alkalmas lehet például lábszárfekély kezelésére, ahol könnyen megoldható a lokális fotoaktiváció (171, 187). A sok ígéretes ötlet és az elérhető fényterápiás eszközök (pl. Bioptron lámpa) garmadája ellenére eddig nem ismert egyetlen nitrozótiol formuláció sem mint a fényterápia eszköze.

### 2.3. Sejtterápia szubcelluláris mechanizmusai

Az elmúlt 10 év egyik kiemelkedő mértékben vizsgált új terápiás lehetősége az iszkémiás károsodások gyógyítása összejt beültetés révén. Annak ellenére, hogy sok preklinikai és klinikai kutatás is eredményesen lezárult, igen kevés biztosat tudunk a sejtterápia pontos molekuláris mechanizmusáról. Általánosan elfogadott, hogy a sejtterápia csökkenteni képes a szívizomzatban a hegszövet mennyiségét és javítja a szívfunkciót. Egy meta-analízis több mint

1000 beteg adataiból számolva arra a megállapításra jutott, hogy egy kismértékű, de szignifikáns ejekciós frakció emelkedés (3.66%) várható a sejttérápiától szívinfarktus után alkalmazva (188). Ez a volumenű hatás azonban messze elmarad a várakozásoktól, különösen annak fényében, hogy a laikus közönség is mekkora elvárásokat támaszt az összejt terápiákkal szemben. A klinikai kísérletek egyik fő tanulsága, hogy annak hiányában, hogy pontosan értenénk a sejtek hatásmechanizmusát a protokollok optimalizálása lehetetlen, ezért a kapott eredményekről nem lehet tudni, hogy tervezési hiba folytán vagy alapvető élettani okok miatt szuboptimális a hatás.

### 2.3.1. A sejttérápia lehetséges hatásmechanizmusai

Ha azt feltételezzük, hogy a sejtek belenőnek a hiányzó szövet által hagyott üregbe és mintegy befoltozzák azt, akkor nagyszámú, lehetőleg elődifferenciált sejtet kell beadni, célszerűen a maradandó károsodás beállta után. Ha viszont azt a hatásmechanizmust feltételezzük, hogy a beadott sejtek parakrin növekedési faktorok segítségével javítják a regenerációt, akkor kevesebb sejt is elég, viszont korán kell őket beadni. Könnyen belátható, hogy csak az időzítés, a sejtek típusa és a beadás módja tekintetében mekkora variabilitás lehetséges, és rossz protokoll választással még egy ígéretes terápiát is el lehet nézni, pl. a túl későn adott sejtek hiába termelnek anabolikus faktorokat, ha a hegképződés már megindult, sőt még ronthatnak is a helyzeten. Több egymással részben konkuráló hipotézis is felvethető a sejttérápia hatásmechanizmusáról: a sejtek transzddifferenciálódnak, fúzionálhatnak a befogadó szövet sejtjeivel, parakrin faktorokat termelhetnek vagy direkt sejtkontaktus révén javítják a posztiszkémiás szövet regenerációját. Elképzelhető, hogy mindegyik fenti mechanizmus működik, de ezek egymáshoz viszonyított jelentősége nem ismert (189, 190).

### 2.3.2. Teljes vagy részleges sejtfúzió

Singla és munkatársai azt figyelték meg, hogy ugyan a sejtek 80-90%-a elpusztul a beültetés után, a szívfunkció mégis javul (191). Az emögött

meghúzódo mechanizmus kutatása során kimutatták, hogy a  $H_2O_2$  indukált apoptózis H9c2 sejteken meggátolható, ha embrionális őssejtek tenyésztésére használt médiumot adnak a sejtekhez, tehát valószínűleg az őssejtek oldékony molekulákat termelnek, amelyek hatnak a sérült sejteken parakrin módon. Más kutatók azt találták, hogy az érett kardiomiociták képesek fúzionálni szomatikus és pluripotens sejtekkel, és ezzel újraprogramozódik az osztódásuk és túlélésük (192-194). A sejtfúzió vizsgálata azonban igen nehéz technikai kérdéseket vet fel, például az esemény közvetlen lefilmezését kivéve minden mérőmódszer kimenetét sejtfúzió nélkül is el lehet képzelni, tehát a specificitásuk csekély. A részleges sejtfúzió, például membránhidak tranziens jelenléte két sejt között gyakrabban megfigyelt folyamat, amely alternatív magyarázatot kínál a fúziós eredményekhez (195-197). *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy endotél sejtek transzdifferentiálódni képesek szívizomsejtté fúzió nélkül, de szükséges hozzá citoplazmikus információ csere (198). Korábbi kísérleteinkben azt láttuk, hogy agyi lézió és embrionális agyi őssejt beültetés után néhány sejt minden bizonnyal fúzió esett át (199), és a továbbiakban ennek a véletlen megfigyelésnek a kutatását terveztük.

### 2.3.3. Mitokondrium-transzfer

Abban az esetben, ha a sejtek egymással részleges fúzióra lépnek, elképzelhető, hogy mitokondriumok is vándorolnak a sejtek között. Mivel a mitokondriumok az egyik fő iniciátorai a sejthalálnak iszkémiás károsodás esetén, ezért igen érdekes hipotéziseket lehet felépíteni arra a gondolatkörre, hogy a károsodott és egészséges sejtek egymással mitokondriumokat vagy mitokondriális információt cserélnek, és ezzel képesek lehetnek a sejthalál kiváltóit egymásnak átjátszani, illetve egészséges mitokondriumok révén ezek hatását pufferelni. Egy kísérletsorozatban Spees és munkatársai kimutatták, hogy mitokondriális transzfer révén egészséges sejtek képesek lehetnek visszaállítani az oxidatív foszforilációt glikolízissel élő, mitokondrium-leadált sejteken (200). A jelen dolgozatban szereplő kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a részleges sejtfúzió, illetve a feltételezhető mitokondriális

információ transzfer a sejtek között milyen szerepet játszik az iszkémiás károsodásban.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Mitokondrium izolálás

A mitokondriumokat percoll-grádiens segítségével izoláltuk (99, 201, 202). Vad típusú egereket a C57Bl/6 törzsből (Jackson, Bar Harbor, ME) túlaltattunk halotánnal és elvéreztettünk. A halotán behatás rövid ideig tartott és a többi preparációs lépés halotánmentes környezetben zajlott, hogy a végső preparátumot ez ne befolyásolja. Az agy, szív és máj szöveteit eltávolítottuk, megmértük a nedves tömegét, majd 12% percollt (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) tartalmazó szukróz oldatban homogenizáltuk kézi vagy gépi homogenizátorral. A szuszpenziót percoll grádiens (24/40%) tetejére rétegeztük és 5 percig centrifugáltuk 19000 rpm-mel. A percoll grádiens váltásánál megrekedő mitokondriális frakciót leszívtuk, majd újra centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk. A pelletet 125 mM K<sup>+</sup> tartalmú, magas ionerősségű oldatban mostuk. Minden fenti lépést jégen végeztünk. Hasonló módszerrel izoláltunk mitokondriumokat nátrium- thiopenthallal (100 mg/kg i.p.) túlaltatott patkány és malac agyszövetből, illetve műtéti anyagból származó humán szív fülcséből.

A mitokondrium preparátumok tisztaságát két független módszerrel ellenőriztük. Rendszeresen készítettünk elektronmikroszkópos képeket az izolált mitokondriumokról, amelyeken csak elvétve lehetett látni felismerhető sejteket vagy sejtalkotókat, lizoszómákat. Ezen felül Western blot technikával mitokondriális markerként a citokróm c-oxidázt, endoplazmás retikulum markerként pedig calreticulint mértünk. A mitokondriális frakcióban a teljes szöveti lizátumhoz képes a citokróm c oxidáz legalább 8-szoros dúsulást mutatott, míg a calreticulin a mitokondriális preparátumokban észrevehető szintre hígult.

#### 3. 2. Sejtenyésztés

Primér patkány agykérgi neuronokat tenyésztettünk E18 Wistar patkány főtuszokból (203). Az izolált agyszövetet Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ba helyeztük (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Kétszer mostuk a szöveteket DMEM-ben, amelyet penicillinnel (Sigma, 100 U/ml) és streptomycinnel (Sigma, 100 µg/ml) egészítettünk ki, majd diszpáz I-ben inkubáltuk (2 U/ml, Roche, Mannheim, Germany) 35 percig 37 °C-on. A reakció leállítását kétszeres DMEM mosással végeztük, majd a sejteket óvatosan trituráltuk és poly-D-lysine bevonattal rendelkező fedőlemezekre helyeztük a fénymikroszkópos vizsgálatokhoz. A sejtek megtapadása után a médiumot lecseréltük Neurobasal mediumra (Gibco BRL), amelyben a következő adalékanyagok voltak: B27 (Gibco BRL, 2 %), L-glutamine (Sigma, 0.5 mM), β-mercaptoethanol (Gibco BRL, 55 µM) és kálium klorid (Sigma, 25 mM). A sejteket 37 °C-on tartottuk 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában, a médiumot minden 3. nap cseréltük. A tenyészetek 98% -a pozitív volt a neuron marker microtubule-associated protein-2-re (Becton-Dickinson) és negatív a gliasejt marker glial fibrillary acidic proteinre (GFAP, Chemicon, Temecula, CA, USA) (204).

Patkány agyi asztrocita kultúrát újszülött Wistar patkányokból indítottunk (205). A fehérállományt leválasztottuk és asztrocita médiumban (DMEM 10% borjúsérummal és antibiotikumokkal, lásd fent) disszociáltuk, majd tenyésztőedénybe helyeztük. A konfluens kultúrákat egy éjszakán át rázattuk 37 °C-on, hogy I-es típusú asztroglia tenyészetet kapjunk. A preparátumok tisztaságát GFAP festéssel ellenőriztük, a sejteket az első passzázsban használtuk fel a kísérletekhez.

H9c2 jelű patkány kardiomioblaszt sejtvonalat az ATCC-től szereztünk be (Wesel, Germany). A sejteket magas glükóz tartalmú (4.5 g/L) DMEM médiumban tartottuk 10% borjúsérum, 4 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin hozzáadásával.

Egér mezenhimális őssejteket (MSC) C57Bl/6 típusú egerek femurjából nyert csontvelőből izoláltunk (206). Az állatokat pentobarbitállal túlaltattuk (ip, 50 mg/kg, Nembutal, Ovation, Deerfield, IL, USA), majd a combcsontokat kipreparáltuk és a csontvelőt kimostuk alacsony glükóz tartalmú DMEM médiummal, amely 10% borjúsérumot, 4 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. A sejteket 1200 rpm-mel

centrifugáltuk, majd T75-ös edényekben tenyésztettük. Négy-öt nap után a nem-adherens sejteket lemostuk. A sejtek karakterizálása szerint pozitívak voltak az MSC specifikus Sca-1 antigénre, de negatívak a differenciációra utaló antigénekre (CD34, CD3 $\epsilon$ , CD45R/B220, CD11b, 6G, és TER-119), illetve képesek voltak oszteoblaszt és adipocita irányba differenciálódni, ezzel igazolva őssejt voltukat (207, 208).

### 3. 3. Konfokális fluoreszcens mikroszkópia

#### 3.3.1. Izolált mitokondrium vizsgálatok

A frissen izolált mitokondriumokat a következő pH 7.0-ás pufferben diszpergáltuk: 125 mmol/l KCl, 2 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l HEPES, 10  $\mu$ mol/l EGTA és poly-D-lysine-nel fedett fedőlemezekre ültettük. A mitokondriumokat maláttal (5 mmol/l) és glutamáttal (5 mmol/l) energizáltuk, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss LSM 510, 63-szoros DIC objektív és fluorescein/rhodamine filter szet). A mitokondriális membránpotenciált MitoFluorRed-del vizsgáltuk, a glibenclamide kötést a zöld fluoreszcens BODIPY-glibenclamide-dal (Molecular Probes, Eugene, OR). A mitokondriumok energizálása után 5 perccel 100  $\mu$ mol/l glibenclamide-ot adtunk a rendszerhez, amelyet további 3 perc múlva mitoK<sub>ATP</sub> nyitó 100  $\mu$ mol/l diazoxide vagy 10  $\mu$ mol/l BMS191095 (Bristol-Myers-Squibb, Princeton, NJ) követett (47). Mindegyik szert 1% dimethyl-sulfoxide-ban oldottuk (DMSO), vehikulum kontrollként csak DMSO-t használtunk. A mitoK<sub>ATP</sub> nyitó hatását a K<sup>+</sup> ionophore nigericinhez (10  $\mu$ mol/l) hasonlítottuk. A MitoFluorRed fluoreszcenciát mértük a peroxy-nitrite decomposition catalyst FP15 (100  $\mu$ mol/l) jelenlétében; miközben a mitokondriális NO termelést a zöld fluoreszcens DAF-FM (7  $\mu$ mol/l; Molecular Probes, Eugene, OR) fluoreszcencia monitorozta.

#### 3.3.2. Izolált neuron és asztrocita vizsgálatok

A tenyésztett sejteket az izolált mitokondriumokhoz hasonló módon vizsgáltuk. A neuronokat és asztrocitákat 1  $\mu$ M BODIPY-glibenclamide-dal és 500 nM MitoTrackerRed-del (Molecular Probes) inkubáltuk 20 percig 37 °C-on. Inkubáció után a sejteket mostuk, majd azonnal a konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

### 3.3.3. Idősorok vizsgálata H9c2 sejteken

A sejteket 42 mm átmérőjű fedőlemezekre ültettük, majd egy zárt inkubációs rendszerbe (Pecan, Németország) helyeztük a mikroszkóp tárgyasztalán (Zeiss LSM 510 META). A sejtek mozgását és a nanotubulusok kialakulását 15 percenként felvett képekkel rögzítettük egy éjszakán át. A mitokondriumok mozgásának monitorozásához a sejteket MitoTrackerRed-del inkubáltuk 1:2000 higításban 10 percig 37 °C-on. A zöld és a piros fluoreszcens fehérjék (GFP and RFP) vizsgálata mikroszkópos képekkel történt az együttenyésztés előtt és után 12 órával. Az átfedési együtthatót (overlap coefficient) az Image Pro Plus szoftverrel számítottuk ki.

### 3.3.4. Mitokondriális transzfekció

A GF és RFP festések kivitelezéséhez a sejteket transzfektáltuk plazmid DNS-sel, amely a 2MTS-EGFP-t vagy 2MTS-mRFP-t kódolta. Ezen konstruktok N-terminális mitokondriális target szekvenciát tartalmaznak, amely megegyezik a humán citokróom c oxidáz 8A alegység N terminusának szekvenciájával (MSVLTPLLLRLTGSARRLPVPRAKIHSL). Egyenként 3 millió sejtet transzfektáltunk 4  $\mu$ g DNS-sel 100  $\mu$ l-ben feloldva (1150 V, 30 ms, 2 pulzus).

## 3.5. Áramlási citometria

Áramlási citometriát az izolált mitokondriumokon a mikroszkópos vizsgálatokhoz hasonlóan végeztünk. Ugyanazokat a mitokondrium szuszpenziókat készítettük elő, majd 5 ml-es citometriás csövekbe helyeztük és BD FACSCalibur típusú áramlási citométerrel lemértük. Százezer jelet vettünk fel



minden mintából, amelyet kapuzás nélkül értékeltünk, mivel a zajszennyezés aránya elhanyagolhatóan kicsi volt.

Áramlási citometriát tripszinált sejtszuszpenzió is végeztünk (0.05% tripszin-EDTA). A sejt kultúrákat az OGD után 24 órával mértünk, kontrollként OGD-n át nem esett sejteket használtunk. A DiO-val jelzett sejteket azonosítottuk és kapuztuk, 10 000 jelet vettünk fel minden mintából.

### 3.6. Elektronmikroszkópia

A frissen izolált mitokondrium mintákat 3 óráig fixáltuk 4% paraformaldehid / 0.05% glutáraldehid elegyében. A mintákat beágyasztuk (LR-white), metszettük, majd bevonat nélküli nikkal rácokra helyeztük. A nem-specifikus kötéseket 2% borjúsérummal és 1:30 higításban kecskesérummal végeztük, amely a másodlagos antitesttel homológ. A metszeteket a  $K_{ATP}$ -csatorna feltételezett alegységei ellen termelt antitestekkel inkubáltuk 1:100 higításban 4 °C-on egy éjszakán át. Az immunogold jelölést 4 órán át tartó inkubációval érték el 6 nm nagyságú arany partikulumokkal jelölt másodlagos antitesttel. A módszer specifitását a primér antitest elhagyásával teszteltük, amely esetben nem volt megfigyelhető arany partikulum a mintákban.

### 3. 7. Western blot

Egyenlő mennyiségű fehérjét vittünk fel 4% - 20% gradiens minigélekre (Invitrogen), majd PVDF membránokra transzferáltuk. Három %-os borjúsérumos blokkolást követően a  $K_{ATP}$ -csatorna alegység Kir 6.1, Kir 6.2, SUR1 vagy SUR2 ellenes antitestekkel (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) inkubáltunk 1:500 higításban, amelyet tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitest inkubáció követett. A jelölés vizualizációját kemilumineszcenciával végeztük. A módszer specifitását a primér antitest elhagyásával teszteltük, vagy pre-adszorbeáltunk az egyes primer antitestekre specifikus blokkoló peptidekkel, amely esetekben a jelek nem voltak láthatóak a blotokon. A fentiekhez hasonló módon végeztünk Western blotokat a NOS ismert variánsai

(eNSO, nNOS, iNOS) ellen is, pozitív kontrollként endotélsejt, agyszövet, illetve aktivált makrofág lisátumot használtunk, ebben a sorrendben.

A mitokondriális dúsulás szemi-kvantitatív méréséhez poolozott preparátumokat használtunk, amelyet növekvő fehérje mennyiségben vittünk fel, majd a membrán különböző expozíciói közül azt analizáltuk, amelyen a halvány és erőteljes csíkok is optimálisan látszanak. A képet összehasonlítottuk egy mitokondriális fehérje citokróm-c-oxidáz eredményével, amely a teljes szövet szuszpenzióhoz képest 8-szorosan dúsult az izolált mitokondrium preparátumokban.

Diabéteszes mintákon formalin fixálás és paraffinos beágyazás és metszés után, nitro tirozin, PAR, AIF és bizonyos esetekben PARP ellenes antitestekkel végeztünk Western blotokat a fenti protokoll szerint.

### 3.8. Két-dimenziós gélelektroforézis

A kétdimenziós gélelektroforézishez az Invitrogen ZOOM IPG Runner rendszert használtuk. Az izoelektromos fókuszálást a következő lépésekkel végeztük: 50V 90 percig, 200V 20 percig, 450V 15 percig, 750V 15 percig 1000V 6 óráig, 2000V 1 óráig egy Bio-Rad PowerPac 3000 segítségével. A csíkokat kétszer 15 percig ekvilibráltuk: 1; 1X NuPAGE LDS reakció puffer 10% NuPAGE redukáló ágenssel, 2; 125 mM alkiláló oldat friss jóddacetamiddal. A csíkokat ezután a ZOOM IPG 4-12% Bis-Tris gélekre helyeztük, majd 0.5% agaróz oldattal fedtük. SDS-PAGE futtatást végeztünk 200V-on 50 percig. Ezután a géleket vagy nitrocellulóz membránra transzferáltuk vagy megfestettük a SilverQuest ezüst alapú fehérje festékkel (Invitrogen No.: LC6070).

### 3.9. Tömegspektrometria

A tömegspektrometriás méréseket a Szegedi Egyetemen végeztük (<http://www.szbk.u-szeged.hu/mslab/>) az alábbi protokoll szerint (<http://ms-facility.ucsf.edu/ingel.html>). A fehérje spotokat a Reflex III matrix assisted laser desorption/ionization, time of flight tömegspektrométeren analizáltuk (MALDI TOF MS, Bruker, Germany). 2,5-dihidroxy-benzoésavat használtunk mátrixként.

Minden spektrumot pozitív reflexiós módban vettünk fel, belső kalibráláshoz tripszin autolízis termékek szolgáltak. Adatbázisnak a National Center for Biotechnology Information nonredundant (NCBI nr) adatbázis szolgált, amelyet a ProteinProspector szoftverrel értünk el. A szekvencia információk kinyeréséhez post source decay (PSD) analízist használtunk.

### 3. 10. Proteomikai számítások

A Kir és a SUR fehérjék, illetve a NOS enzimek primer szekvenciáját a Swissprot adatbázisból nyertük ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). A mitokondriális transzport szekvenciák azonosítását, predikcióját az iPsort szoftverrel végeztük Lopez és munkatársainak munkája alapján (2009). Pozitív és negatív kontrollként ismert citoplazmikus és mitokondriális fehérjéket alkalmaztunk.

### 3.11. NOS enzimaktivitás mérése arginin-citrullin konverzió révén

Az esszét duplikátumban végeztük 100  $\mu$ l izolált mitokondrium mintákon (protein koncentráció 1-4  $\mu$ g/ $\mu$ l). Agy és szív mitokondriumokból 2-3 állat mintáit kellett poolozni egy-egy méréshez elegendő minta előállításához. A mintákat 75  $\mu$ l  $^{14}\text{C}$ -jelölt argininnel (331 mCi/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) inkubáltuk Tris bufferben, 25  $\mu$ l kofaktorok (2  $\mu$ mol/l FMN, 2  $\mu$ mol/l r FAD és 10  $\mu$ mol/l  $\text{BH}_4$ ) jelenlétében 30 percig 32 °C-on. Az arginint egy Dowex iX-8 oszlopon futtattuk és leoldottuk a következő pufferrel: 66.7 mmol/l Tris, 2.7 mmol/l NADPH és 3.33 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  pH 7.4-en. Az argináz aktivitást 1 mmol/l ornitinnel gátoltuk. Az arginint a citrullintól ioncserélő oszlopon választottuk el (0.5 ml Dowex-50 W gyanta, 50X8-400, Sigma, St. Louis). A  $^{14}\text{C}$ -citrullin frakciókat 7 ml-es edényekbe tettük, majd 3 ml szcintillációs folyadékot adtunk hozzá (Bio-Safe II, Research Product International Corp., Mount Prospect, IL) és az izotóp aktivitást szcintillációs számlálóban mértük. Az enzimaktivitást pmol citrulline per milligram fehérje per perc mértékegységben adtuk meg. A kalmodulin függést 100  $\mu$ mol/l calmidazolium hozzáadásával vizsgáltuk. A háttér

aktivitást kofaktorok nélkül, 100  $\mu\text{mol/l}$  L-NAME hozzáadása mellett mértük, amelyet levontunk minden mérési eredményből.

### 3.12. PARP enzimaktivitás esszé

A PARP enzimaktivitás mérésére kolorimetriás esszét használtunk (Trevigen). Hiszton-borítással ellátott 96 lyukú lemezekben a biotinilált PAR mennyiségét mértük aktivált DNS és PAR puffer jelenlétében. Egy egység rekombináns PARP enzimet használtunk pozitív kontrollként, a végső reakcióelegy mennyisége minden esetben 50  $\mu\text{l}$  volt. A negatív kontrollból kihagytuk az enzimet. Fél egység KGDH vagy DLDH aktivitását mértük, a PARP inhibitor 3-aminobenzamide (2mM) jelenlétében. A DLDH és KGDH komplexek aktivitását is mértük 50mM  $\text{NaHPO}_4$  hozzáadásával pH 7.5-ön Igamberdiev és munkatársainak mérései alapján (210). A DLDH és KGDH PAR-ilációs hatását Western blot technikával is kimutattuk, amelyben anti-PAR antitestet használtunk. A mérés előtt az enzimeket pre-inkubáltuk a következő oldatban: 100 $\mu\text{l}$  50mM  $\text{NaHPO}_4$ , 10 $\mu\text{l}$  10mM NADH, 10 $\mu\text{l}$  20mM  $\text{FAD}^+$ , 20 $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 125 $\mu\text{l}$  KGDH (Sigma K1502) vagy 100 $\mu\text{l}$  DLDH (Sigma L-2002).

### 3. 13. Ingadozó cukorszint modell

A reaktív oxigén származékokat a munkatársaink által korábban leírt módszerek alapján mértük (30, 211). Endotél sejt szuszpenziót szintelen M199 médiumba helyeztünk 5 vagy 30 mM glükóz tartalommal. A szabadgyök-érzékeny fluoreszcens festéket, hidroetidint (Molecular Probes) adtuk a szuszpenzióhoz 0.01 mg/ml -es dózisban és 10 percig inkubáltuk, hogy a sejtmagi szabadgyök szintet mérjük. Redukált MitoTrackerRed CMX rosamine-t (Molecular Probes) használtunk 500 nM-es dózisban a mitokondriális szabadgyök szint mérésére. A fluoreszcencia intenzitást áramlási citométeren (BD FACS calibur) mértük 25 000 jeltől. A mérést kétszer megismételtük friss sejtenyészetből. Reprezentatív fluoreszcens képeket ugyanezekből a tenyészetekből konfokális mikroszkóppal készítettünk, amellyel egyúttal a flureszcens festékek sejten belüli elhelyezkedését is tudtuk igazolni.

### 3.14. Szimulált iszkémia modell

Az iszkémia-reperfúziót *in vitro* oxigén-glükóz deprivációval (OGD) modelleztünk. A sejteket glükózmentes DMEM-ben inkubáltunk 0.5% O<sub>2</sub> és 99.5% N<sub>2</sub> atmoszférában 150 percig a konfokális mikroszkóp tárgyasztalára szerelt kamrában (PECON incubation system, Erbach-Bach, Germany). A sejtek életképességét calcein-AM festéssel (gerjesztés/kibocsájtás 494/517 nm), míg az elpusztult sejteket etídium-homodimerrel (gerjesztés/kibocsájtás 528/617 nm) vizsgáltuk. A H9c2, mint befogadó, és a különféle sejtvonalból származó, de a kísérletek többségében használt egér MSC sejteket az együtt-tenyésztés (ko-kultiváció) előtt a vitális Vybrant DiO (gerjesztés/kibocsájtás: 488/501 nm) és DiD (gerjesztés/kibocsájtás: 633/665 nm) (Molecular Probes, USA) festékekkel jelöltük 1:200 higításban 30 percig 37 °C-on. A DiO-jelölt H9c2 12-lyukú lemezekre szélesztettük 30 000 sejt/lyuk denzitásban 2 ml oldatban. A sejteket 150 perces OGD-nek tettük ki, majd 20,000 DiD-jelölt megmentő sejtet adtunk hozzájuk 30 perccel a "reperfúziót" követően. Bizonyos kísérletekben a sejtek fizikai elválasztásához az edényekben betéteket használtunk (0.4 µm pórusméret, Becton Dickinson, NJ, USA). H9c2 sejtek, amelyek nem kaptak megmentő sejteket szolgáltak kontrollként. A sejteket további 24 órán át tenyésztettük, majd megfestettük a halott sejteket jelölő ethidium homodimerrel (4 µM, 30 perc, 37 °C), majd konfokális mikroszkóppal vagy áramlási citométerrel vizsgáltuk őket (lásd feljebb).

### 3.15. A mitokondriális funkció gátlása sejtenyészeten

Két különböző módszert alkalmaztunk a mitokondriális funkció tartós gátlásához, amelyek mellett a sejtek életképesek maradnak. A mitokondriális DNS deplécióját 50 ng/ml etídium-bromid (EtBr) hozzáadásával értük el, amellyel 2 hónapig tenyésztettük a sejteket. A mitokondriális légzési lánc irreverzibilis gátlásához a sejteket különböző koncentrációjú F16-tal kezeltük 48 óráig, majd a mitokondriális funkciót monitoroztuk MitoTrackerRed festéssel. A 0,2 mM F16 kezelés kellően lecsökkentette a mitokondriális membránpotenciált,

míg a sejtek szaporodóképessége ugyan csökkent, de kezelhető mértékben megmaradt, ezért ezt a dózist használtuk a kísérletekhez.

### 3.16. Humán szövetminták vétele terhességi cukorbetegségben

A 16. gesztációs héten minden terhesen orális glükóz tolerancia tesztet (oGTT) végeztünk, amelyet a negatív esetekben a 26. héten megismételtünk. Azok az anyák, akik éhomi glükóz szintje  $\geq 7$  mmol/L vagy a 120 perces terhelés utáni glükóz szintje  $\geq 7.8$  mmol/L a WHP kritériumok alapján terhességi cukorbetegeknek tekintendőek. A betegeket első lépésben 160-200 gramm szénhidrát tartalmú diétával kezeltük, amelyet vércukor kontroll mellett folytattak. Inszulin kezelést akkor kezdtünk, amikor az éhomi cukorszint magasabb volt 5,5 mmol/L-nél, vagy az egyórás posztprandiális cukorszint magasabb volt 7 mmol/L-nél. A kismamák felvilágosítása és beleegyezése után vérmintát vettünk egészséges (n=25) és terhességi cukorbeteg (diétával kezelt n=22, inzulinnal kezelt n=5) terhesekből a 16-29. és 36-40. héten. Leukocitaszám, C-reactive protein (CRP), máj és vesefunkciót is mértünk, amelyek mind a normál tartományban voltak. Egy másik cohortban a szülés után szövetmintát gyűjtöttünk a méhlepényből és a köldökzsinórból (egészséges n=6, diétával kezelt=9, inzulinnal kezelt n=5).

### 3.17. Mikrocirkuláció mérés patkány diabétesz modellben

Felnőtt hím Wistar patkányoknak streptozoocint adtunk (70 mg/kg iv) és 5% glükóz tartalmú vízzel itattunk, amely után 7 nappal minden állat vércukor szintje 25 mM felett volt. A kísérleteket 3 héttel később végeztük. A halotánnal altatott állatok talpbőrére Pluronic F-127 hidrogélt tettünk, amely 0.23 vagy 0.023 M GSNO-t vagy vehikulumot tartalmazott. A talpbőr véráramlását 5 percenként mértük lézer-doppler mérőfejjel (Moor Instruments Ltd) 30 percen keresztül.

## 4. Eredmények

### 4.1. Mitokondriális ATP-függő kálium csatornák szerepe iszkémiában

#### 4.1.1. $K_{ATP}$ csatorna alegységek azonosítása a mitokondriumok membránjában

Mitokondriumok kis csoportjait hoztunk látótérbe izoláltan vagy neuron illetve asztroglia sejteken belül konfokális mikroszkóppal. A membránpotenciál-függő festék MitoFluorRed jól festette a mitokondriumokat, amely arra utalt, hogy az organellek membránpotenciálja ép, a respiráció működik. A zöld fluoreszcens szulfonilurea BODIPY-glibenclamide ( $1\ \mu\text{M}$ ) specifikusan kötődött a mitokondriumokhoz, igazolva ezzel, hogy a mitokondriumokon van szulfonilurea receptor (SUR), amely a  $K_{ATP}$  csatornák kötelező alegysége (4. ábra). A citoplazma, endoplazmás reticulum és a sejtmag nem festődött, ezzel igazolva a festés specificitását. Mivel a szulfonilurea kötődés nem csak az egyik alegységét jelöli a hipotetikus  $K_{ATP}$  csatornának, ezért további vizsgálatokkal igyekeztünk azonosítani a pórus formáló alegységeket is.

Teljes agyszövet homogenizátumon és izolált mitokondriumokon Western blotokat végeztünk a feltehető  $K_{ATP}$  csatorna alegység Kir6.1, Kir 6.2, SUR1 és SUR2 ellenes antitestekkel. Az anti-Kir 6.1 antitest egy fehérjét jelölt  $\sim 50\ \text{kDa}$  körüli méretben, amely erőteljesen dúsult a mitokondriumban ( $\sim 8$ -szorosán). A fehérje súlya jól egyezik a Kir 6.1 számított molekulasúlyával, amely  $47\ \text{kDa}$ . Egy másik, szintén  $\sim 50\ \text{kDa}$  fehérjét ismert fel a Kir 6.2 antitest a mitokondriumokban, ez azonban nem dúsult a mitokondriumban, ezért a specificitása nem meggyőző.

Az anti-SUR1 antitest egy  $\sim 40\ \text{kDa}$  méretű fehérjét ismert fel, de ez szintén nem dúsult a mitokondriumokban és a molekulasúlya is túl alacsony a SUR1-hez képest. Ezzel szemben az anti-SUR2 antitest két, mitokondriumokban dúsuló ( $\sim 8$  szoros) fehérjét talált  $\sim 30$  és  $\sim 130\ \text{kDa}$  körül. Teljes agyi homogenizátumban egy további,  $\sim 175\ \text{kDa}$  méretű fehérjét is találtunk, amelynek a molekulasúlya jól egyezik a SUR2 szekvenciából számított

molekulasúlyával (174 kDa), de ez a fehérje nem volt jelen a mitokondriumokban.

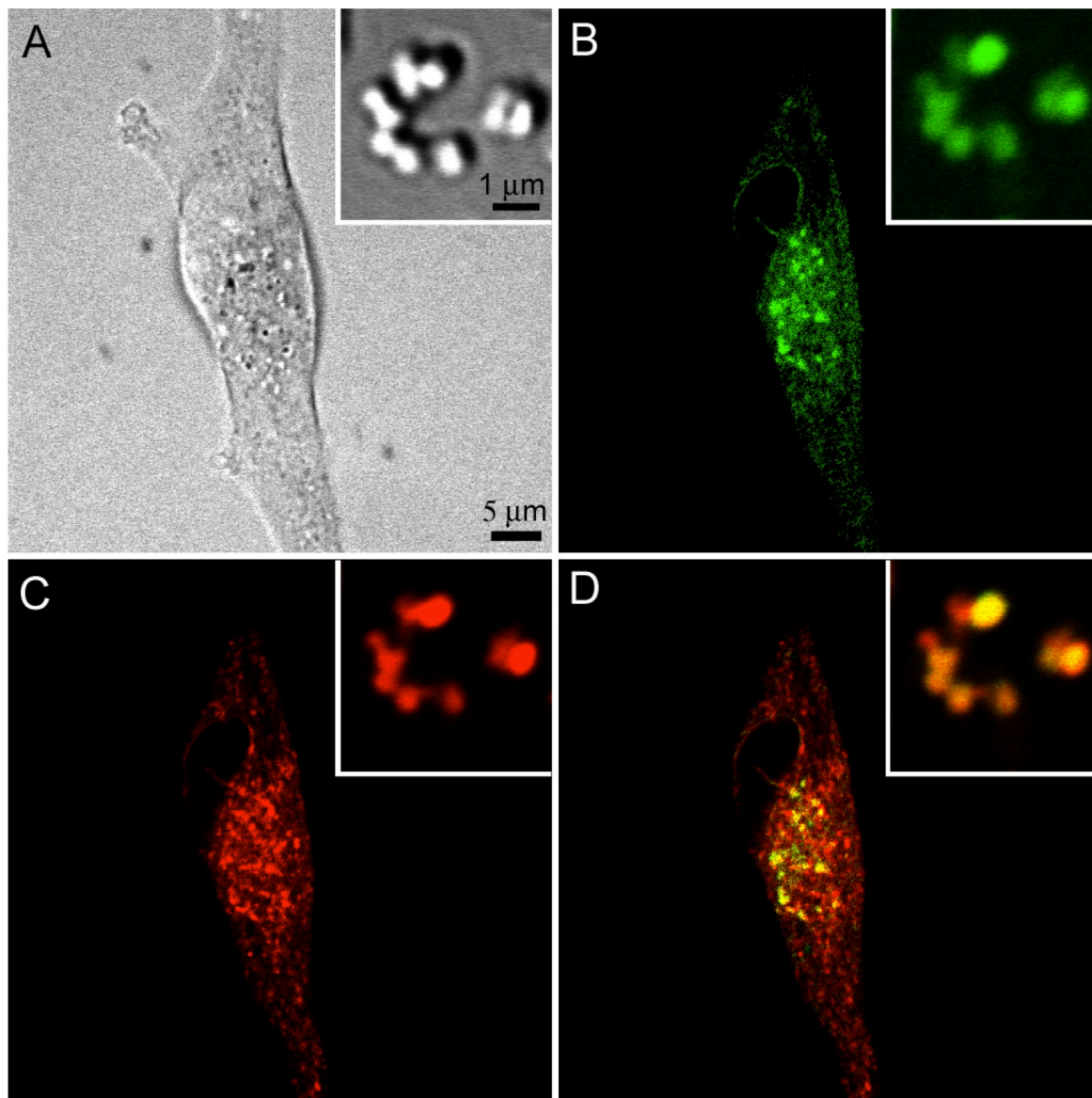
A  $K_{ATP}$  csatornák ultrastrukturális lokalizációját immunogold elektronmikroszkópiával vizsgáltuk. A SUR2 és Kir 6.1 jelölés a mitokondriális membránokhoz kapcsolódott, míg a SUR1 vagy Kir 6.2 nem mutatott mitokondriális lokalizációt.

Az összes lehetséges és ismert  $K_{ATP}$  alegység szekvenciáját *in silico* vizsgálva azt találtuk, hogy mind a Kir 6.1 mind a Kir 6.2 rendelkezik N-terminális mitokondriális transzport szekvenciával. Ez arra utal, hogy ezek a fehérjék a transzláció után a mitokondriumokba vándorolnak. Ezzel szemben egyik ismert SUR szekvenciában sem tudtunk azonosítani mitokondriális transzport jelet az N-terminálison. Érdekes módon viszont a SUR2 esetében a szekvencia belsejében találtunk egy valószínűsíthető mitokondriális transzport tag-et, amely arra utal hogy a teljes fehérjének egy rövidebb variánsa lehetséges, hogy a mitokondriumba targetált.

**2. táblázat.** A  $K_{ATP}$  csatorna alegységek transzport szekvenciájának azonosítása. A kalkulációkhoz az iPsort szoftvert használtuk, amely Lopez és munkatársai mérései alapján mutatja ki a mitokondriális target szekvenciákat a megadott primer szekvencia N-terminálisán (209).

Alegység	Molekulasúly	Lokáció	Szekvencia
Kir 6.1	~ 48	13-21	VL—ARIAA
Kir 6.2	~ 44	23-31	VL—T-RLA
SUR-1	~ 177	nincs találat	nincs találat
SUR-2	~ 174	232-238	NT--LIISA





**4. ábra.** KATP csatornák azonosítása izolált neuronokban és mitokondriumokon. A konfokális fluoreszcens mikroszkóppal készült képen zöld szín jelöli a fluoreszcens festékkel konjugált KATP csatorna gátló glibenclamide-ot (BODIPY-glibenclamide), piros szín pedig a mitokondriumokat jelölő MitoTrackerRed-et. A kis képen ugyanez a festés izolált agy mitokondriumokkal látható. Sárga szín jelenti hogy a glibenclamide-kötés és a mitokondriumok kolokalizálnak.

#### 4.1.2. Funkcionális mérések a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ csatornákkal

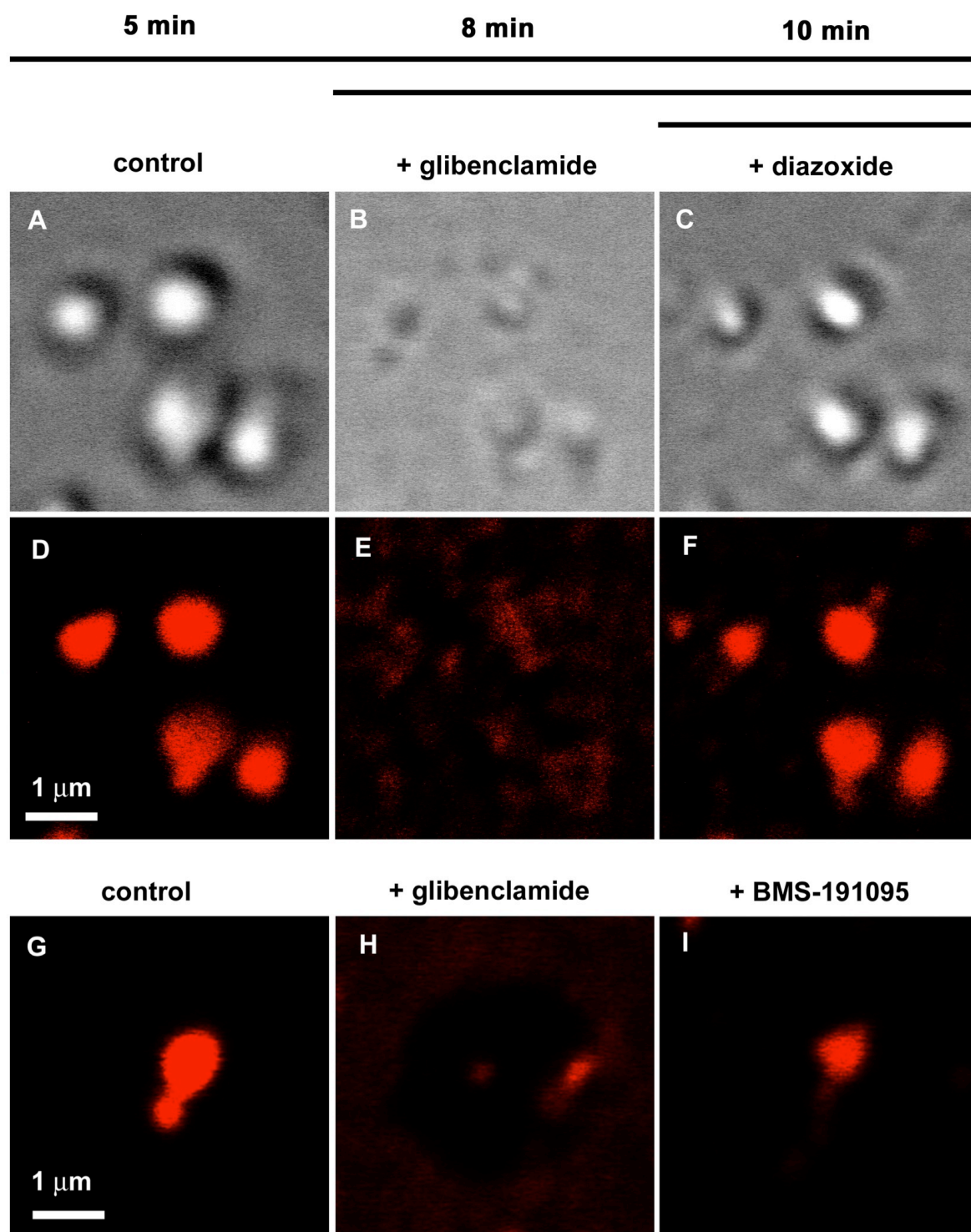
Izolált mitokondriumokat glutamát és malát hozzáadásával energizáltunk  $\text{K}^+$ -pufferben, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltunk. Az organelleumokat a membránpotenciál-érzékeny MitoFluorRed-del festettünk ( $1 \mu\text{M}$ ). Glibenclamide ( $100 \mu\text{M}$ ) hozzáadása jelentősen lecsökkentette a MitoFluorRed jelet, amelyet vissza lehetett fordítani a  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  nyitó diazoxide ( $100 \mu\text{M}$ ,  $n=18$ ) vagy BMS-191095 ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ) hozzáadásával (5. ábra). A szerek vehikuluma (1% DMSO) nem volt hatással a mitokondriális fluoreszcenciára ( $n=6$ ). Annak érdekében, hogy a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  nyitó szerek hatása valóban a  $\text{K}^+$  áramok befolyásolásán alapul, a  $\text{K}^+$  ionofór nigericint használtuk. Nigericin ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n=4$ ) alkalmazása visszafordította a glibenclamide hatását éppúgy, mint a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  nyitó szerek, igazolva ezzel, hogy a MitoFluorRed fluoreszcencia valóban a kálium-áramok megváltozása következtében tűnik el illetve tér vissza.

A fluoreszcencia mellett jelentős változásokat figyeltünk meg az átmenő fényben felvett DIC képen is: a csatornák zárása glibenclamide-dal a kontraszt elvesztéséhez és a kép kifényesedéséhez vezetett, míg ezt a reakciót is vissza lehetett fordítani a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  nyitó szerekkel (5. ábra). A fényszórásban megfigyelt változásokról korábban leírták, hogy közvetlenül a  $\text{K}^+$  áramokkal áll kapcsolatban, és további bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a mitokondriális membránokban  $\text{K}_{\text{ATP}}$  csatornák működnek.

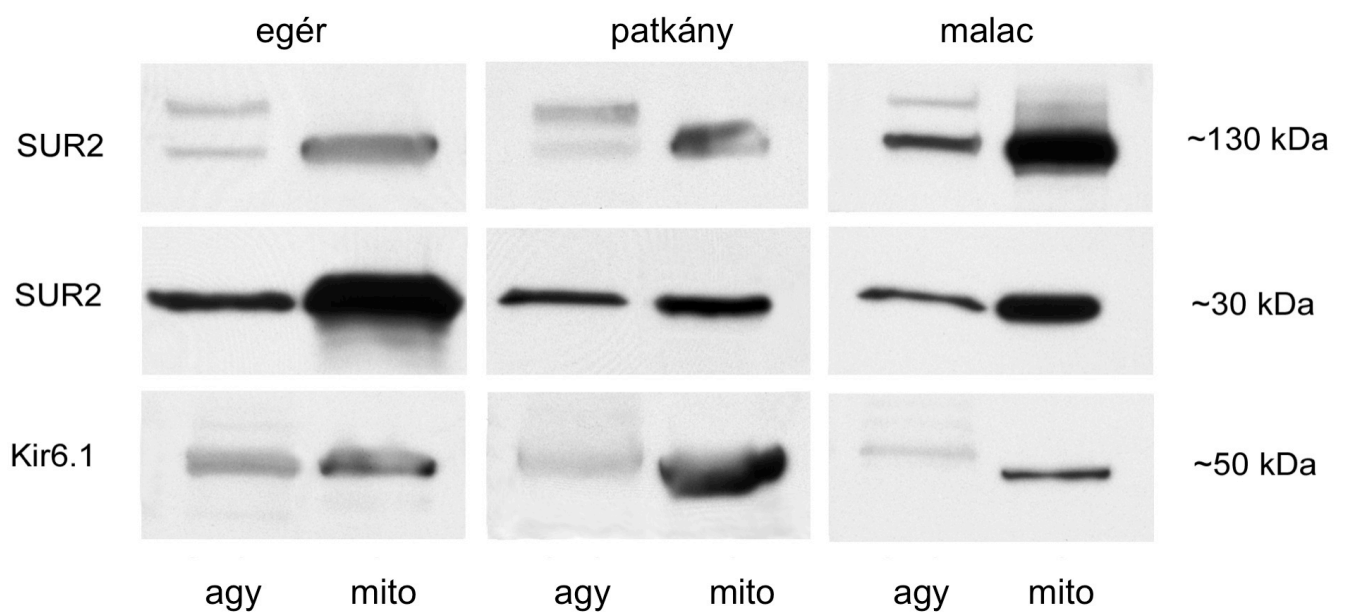
Izolált mitokondriumok jól festődnek az NO-érzékeny DAF-FM festékkel (lásd alább). A DAF-FM jelet teljes mértékben gátolni tudta a ONOO<sup>-</sup> decomposition catalyst FP15, amely arra utal, hogy a mitokondriális NO gyorsan ONOO<sup>-</sup>-té alakul. A mitokondriumok kezelése FP15-tel szintén csökkentette a MitoFluorRed fluoreszcenciát, amelyet diazoxide ( $n=6$ ) képes volt visszafordítani. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a mitokondriális NO és  $\text{K}_{\text{ATP}}$  rendszerek között van funkcionális kapcsolat.

#### 4.1.3. Fajok közötti összehasonlítás

Annak érdekében, hogy a mitoK<sub>ATP</sub> alegységek univerzális voltát teszteljük, több fajban is megismételtük a méréseket. Az egér agy mitokondrium minták mellett (n=8), agyi mitokondriumokat izoláltunk patkányból (n=4) és malacból (n=3). A Western blotok az anti-Kir 6.1 és anti-SUR2 antitestek esetében hasonló eredményeket mutattak mindhárom faj esetében, azaz a Kir 6.1 és SUR2 -szerű fehérjék erősen dúsulnak a mitokondriumokban (6. ábra).



**5.. ábra.** KATP csatorna gátló és nyitó szerek hatása izolált mitokondriumokon. A mitokondriumokat konfokális fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, a vörös fluoreszcenciát a mitokondriális membránpotenciál függő mitofluor-Red festék adja. Az alapesetben erős membránpotenciállal rendelkező mitokondriumok a KATP csatorna gátló glibenclamide hatására elveszítik fluoreszcenciájukat és megváltozik a fény refrakciójuk (amely ismert hatása a K beáramlásnak). A hatás a mitoKATP nyitó diazoxid vagy BMS-191095 alkalmazásakor visszafordítható.



**6. ábra.** Fajok közötti összehasonlítás potenciális mitoKATP alegységek között. Mind egér, mind patkány, mind újszülött malac preparátumokban ugyanazok a fehérjék voltak kimutathatóak Western blot technikával. á

#### 4.1.4. mitok<sub>ATP</sub> alegységek szív mitokondriumokon

Az agy mitokondriumokhoz hasonlóan, ugyanolyan farmakológiai hatást váltottunk ki glibenclamide-dal és diazoxide-dal, illetve BODIPY-glibenclamide-dal, ezért ezen kísérleteket a dolgozatban részletesen nem tárgyaljuk. Az egyes csatornák feltételezett alegységei tekintetében azonban részben megerősítő, részben eltérő eredményre jutottunk, mint az agyban.

Az anti-Kir 6.1 antitesttel végzett blottolás egy ~50 kDa körüli csíkot mutatott, míg az anti-Kir 6.2 antitest egy szintén ~50 kDa súlyú, de kettőzött csíkot ismert fel. A kettős csík alsó felét kismértékben módosította a redukáló reakcióelegy. Annak érdekében, hogy a két antitest által felismert fehérjék azonos vagy különböző voltát vizsgáljuk, először anti-Kir6.2-vel jelöltünk, majd ugyanazt a membránt letisztítottuk és anti-Kir6.1-gyel jelöltük. Két oszlop nem kapott a második körben primér antitestet, ezek szolgáltak kontrollként a tisztítás hatékonyságához. A kettős csík felső felét mindkét antitest felismerte, viszont az alsó csíkot csak a Kir6.2 antitest.

A mitokondriális membránokon való lokalizációt immunogold elektronmikroszkópiával végeztük. Mind a Kir6.1 mind a Kir6.2 a belső mitokondriális membránban és a mátrixban lokalizálódott (7. ábra).

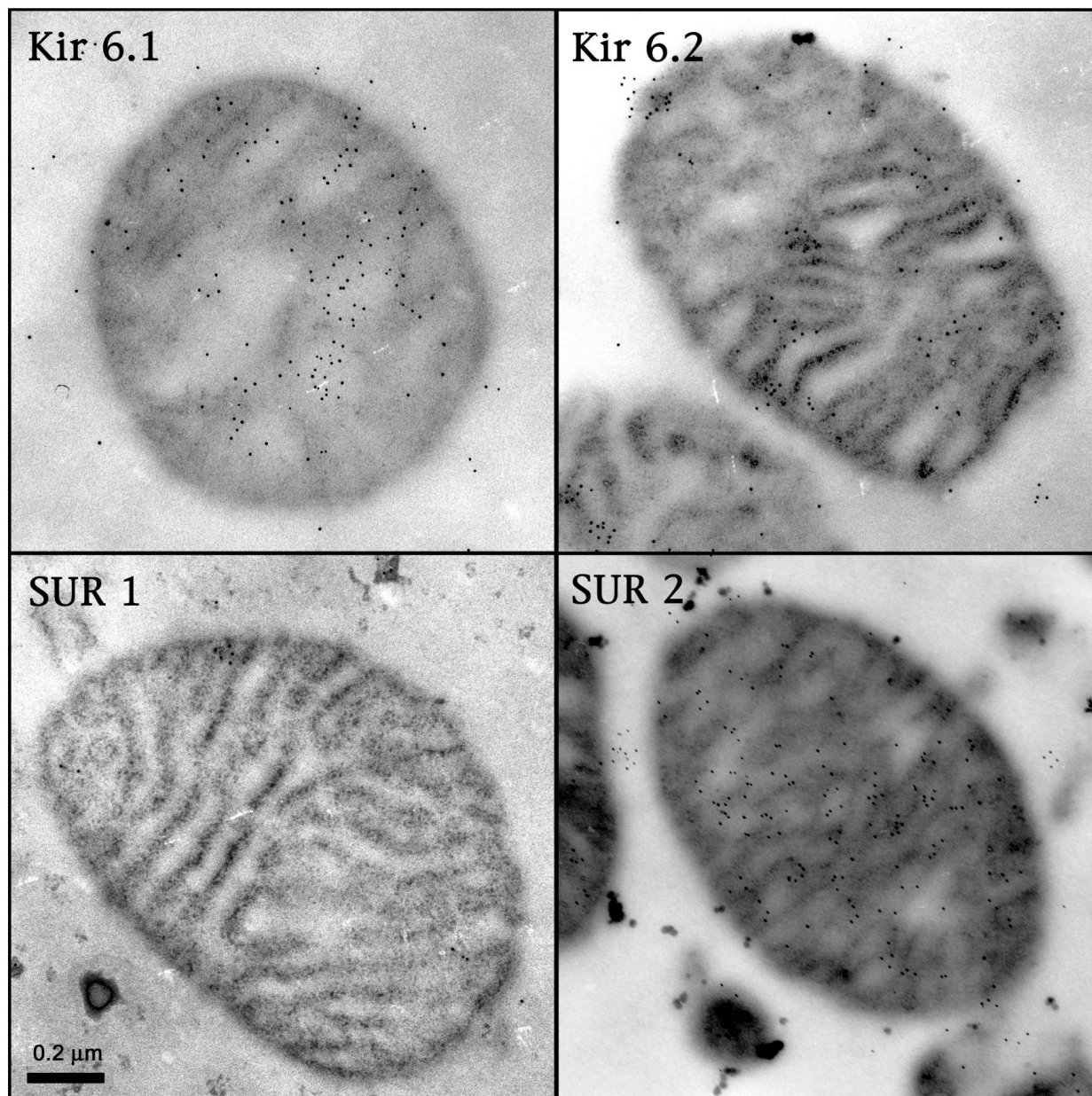
A SUR1 antitesttel végzett Western blot egy halvány ~50 kDa körüli fehérjét ismert fel, amelynek viszont nem volt mitokondriális dúsulása és az immunogold elektronmikroszkópia sem volt pozitív a SUR1 antitesttel. Mivel ennek a fehérjének a molekulásúlya is kisebb, mint a SUR1 elvárt tömege (140-175 kDa, a poszttranszlációs módosításoktól függően) és a SUR1 szekvenciában mitokondriális transzport szekvenciát sem azonosítottunk (lásd fent), ezért a SUR1 nem valószínű, hogy a mitokondriumban jelen van.

Ezzel szemben a SUR2 antitest egy mitokondriumban dúsuló ~25 kDa nagyságú fehérjét jelöl, és az immunogold elektronmikroszkópia is erőteljes mitokondriális festést mutat SUR2 antitesttel (7. ábra). A talált fehérje azonban jelentősen kisebb, mint ami a SUR2-től elvárható lenne (175 kDa). Továbbá, ez a fehérje jelen volt a SUR2 knockout állatokban is, amely kizárja, hogy a SUR2 gén terméke lenne.

A Kir és SUR alegységek közötti kapcsolatot ko-immunprecipitációval végeztük. Izolált szív mitokondriumokból és szöveti lizátumból immunprecipitáltunk antiKir6.1 és anti-Kir6.2 antitestekkel, majd Western blotot végeztünk antiSUR2 antitesttel. Mindkét Kir antitest sikeresen izolálta a 175 kDa méretű SUR2-t a szív lizátumból, de nem volt képes semmilyen fehérjét, így a 30 kDa körüli variánst sem izolálni a mitokondriumokból (8. ábra). A SUR2 antitest specificitását ellenőriztük azzal, hogy preadszorbeáltuk az antitestet a blokkoló peptidjével, amely a Western blotokon teljesen negatív eredményt hozott.

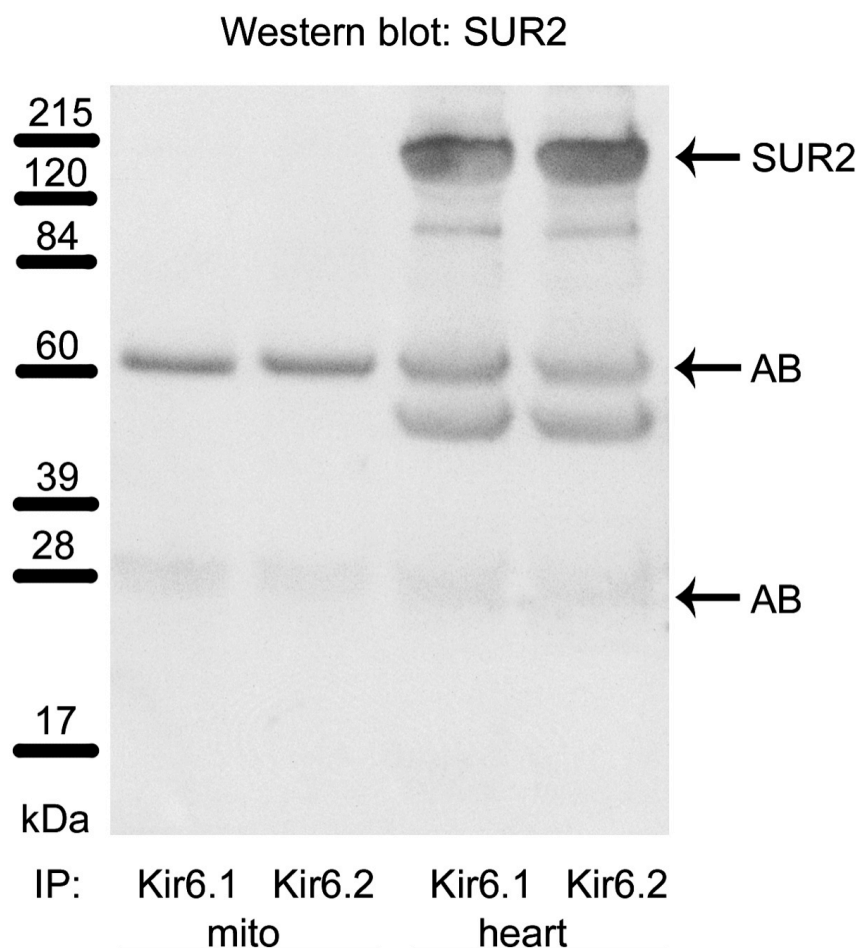
Később ezeket a kísérleteket részben megismételtük humán szív fülcséből izolált mitokondriumokkal is, amelyek hasonló képet mutattak, azaz a blotokon a valószínűsíthető Kir alegységek jelen voltak, de megfelelő méretű SUR alegységet antitestekkel nem tudtunk kimutatni (nem közölt megfigyelések).





**7. ábra.** Immunogold elektronmikroszkópia KATP alegységeket felismerő antitestekkel. A Kir6.1, Kir6.2 és a SUR2 pozitív, míg a SUR1 negatív jelet ad izolált egér szív mitokondriumokon.



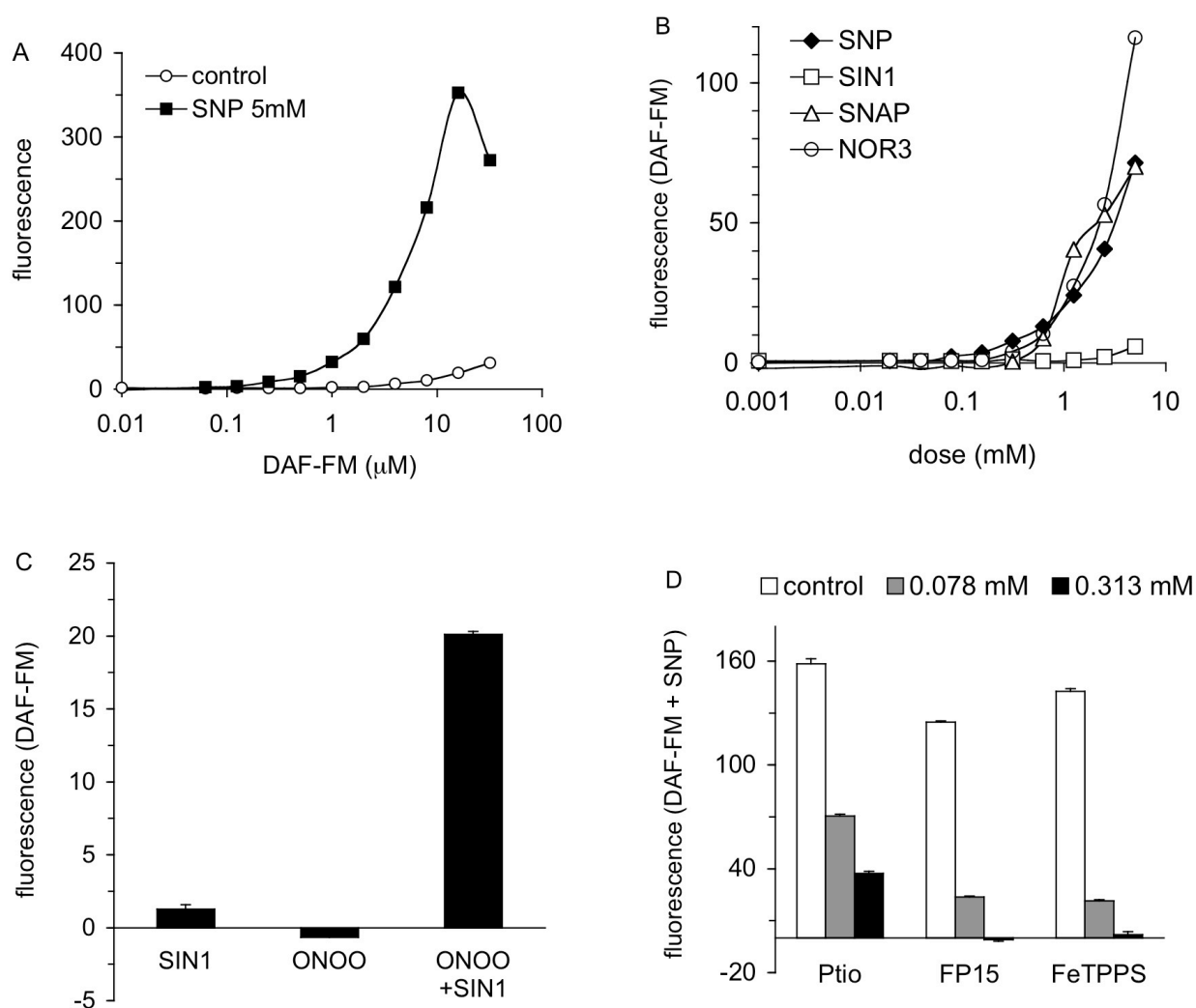


**8. ábra.** Immunprecipitáció  $K_{ATP}$  csatorna alegységekkel. AZ immunprecipitációt a pórus-formáló Kir6.1 vagy Kir6.2 alegységekkel végeztük, majd blottoltunk SUR2 ellenes antitesttel. Teljes szív homogenizátumban mindkét Kir fehérje magával ragad 170 kDa méretű SUR alegységet, amely a módszer pozitív kontrollja. Ezzel szemben a mitokondriumokban csak egy halvány 28 kDa nagyságú fehérje ábrázolódik. A 60 kDa-os csík a precipitáló antitestre utal.

## 4.2. Mitokondriális nitrogén monoxid (NO) termelés mechanizmusa

### 4.2.5. Mit is mér pontosan a DAF-FM fluoreszcencia?

Mivel a funkcionális kísérleteink igen jelentősen támaszkodnak a DAF-FM fluoreszcenciára, ezért alaposabban megvizsgáltuk a festék specificitást olyan körülmények között, amelyek a saját kísérleteinket jellemzik. Magas  $K^+$  tartalmú oldatban, amilyenben a mitokondriális mikroszkópos vagy áramlási citometriás vizsgálatokat végezzük a festék jól reagált többféle NO-donor jelenlétében (9. ábra), de nem emelkedett a fluoreszcenciája  $ONOO^-$ ,  $NO^-$ ,  $O_2^-$  vagy  $H_2O_2$  adására. Érdekes módon azonban, amikor az NO donort együtt adtuk  $ONOO^-$ -tel, akkor a fluoreszcencia igen jelentősen fokozódott (9. ábra). Egy másik munkacsoport is hasonló eredményt talált, miszerint a daiminofluorescein ugyan nem reagál közvetlenül  $ONOO^-$ -tel, de az potenciózza az NO hatását (113). Ezt a nézetet erősíti a saját megfigyelésünk is, miszerint a  $ONOO^-$  decomposition catalyst FP15 vagy FeTPPS erősebben volt képes gátolni a DAF-FM fluoreszcenciát, mint az NO scavenger PTIO (9. ábra). Ezek az eredmények összességükben arra utalnak, hogy a DAF-FM az általunk használt kísérleti körülmények között specifikusan az NO-val reagál, de ezt potenciózza a  $ONOO^-$  jelenléte, azaz lehetséges, hogy inkább az NO egy származékát vizsgáljuk az adott festékekkel. Az mindenesetre egyértelmű, hogy a festék nem reagál reaktív oxigén gyökökkel.

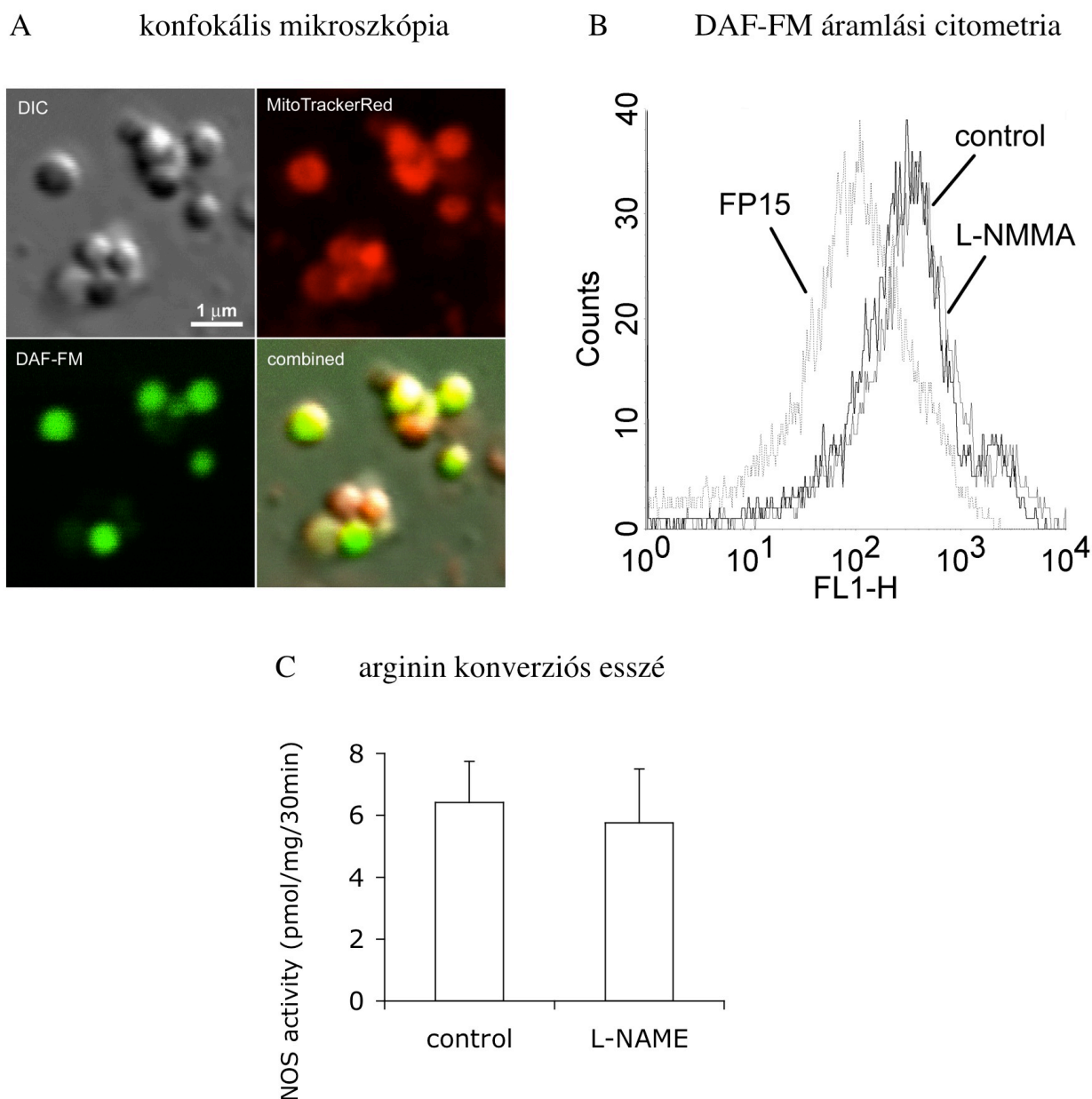


**9. ábra.** Mit mér pontosan a DAF-FM fluoreszcencia? Az A panelen dózis-hatás görbe látható növekvő DAF-FM koncentrációkkal az NO-donor SNP jelenlétében illetve anélkül. Jól látható hogy az SNP jelentősen növeli a fluoreszcenciát, különösen 1-10  $\mu\text{M}$  között. A B panelen különböző kémiai szerkezetű NO donorok hatása látható. A C panelen a SIN-1 és a ONOO szinergista hatását mértük: a SIN-1 kizárólag NO-t ad le, amely a peroxinitrittel reagálva sokkal jelentősebben aktiválja a DAF-FM-et mint külön-külön. A D panelen NO scavengenek hatása látható a DAF-FM fluoreszcenciára.

#### 4.2.1. Termelnek-e a mitokondriumok mérhető NO-t?

Az izolált egér máj mitokondriumok konfokális mikroszkópos vizualizációja azt mutatta, hogy az organellek felveszik a membránpotenciál érzékeny MitoFluorRed festéket, tehát a preparátum megfelelően életképes. A mitokondriumok egy igen erős DAF-FM jelet is mutattak. Észrevettük azt is, hogy a mitokondriumok DAF fluoreszcenciája heterogén: hasonló morfológiával és MitoFluorRed fluoreszcenciával rendelkező, egymás közvetlen közelében lévő mitokondriumok között is igen nagy különbségek voltak a DAF fluoreszcenciában (10. ábra). A fluoreszcencia kvantitatív mérése azt mutatta, hogy a ONOO<sup>-</sup> decomposition catalyst FP15 jelentősen gátolta a fluoreszcenciát, míg a NOS gátló L-NMMA nem (10. ábra). Ezen felül azt is vizsgáltuk, hogy a Ca<sup>++</sup> szint változtatása (0 - 10  $\mu$ M) vagy az L-arginine koncentráció (0 - 1 mM), amelyekről jól ismert, hogy a NOS enzimet befolyásolják, nem voltak hatással a mitokondriális DAF fluoreszcenciára. A mitokondriális NOS-aktivitást mértük az arginine-citrulline konverziós esszével, és egy alacsony, de jól mérhető aktivitást találtunk (n=8) (10. ábra). Érdekes módon viszont az aktivitást nem tudta gátolni a klasszikus NOS gátlószer L-NAME (100  $\mu$ M). Összehasonlításként megmértük a NOS aktivitást teljes agy homogenizátumban is. Az agy arginin konverziós aktivitása majdnem 100-szorosa volt a máj mitokondriumokban mérhetőnek (887 $\pm$ 25 pmol/mg/30min versus 11 $\pm$ 2 pmol/mg/30min), amely jól korrelál az irodalomban leírt adatokkal (212, 213).

Megpróbálkoztunk azzal is, hogy a K<sub>ATP</sub> csatorna alegységekhez hasonlóan mitokondriális target szekvenciákat azonosítsunk *in silico* módszerekkel az ismert NOS fehérjéken. Az algoritmus ugyan jól működött kontrollként használt mitokondriális és citoplazmikus fehérjéken, de egyik NOS szekvenciában sem talált mitokondriális targetálásra utaló peptid csoportot.



**10. ábra.** Mitokondriális NO és nitrogén tartalmú oxidánsok mérése. Az A panelen izolált egér máj mitokondriumok konfokális mikroszkópos képe látható kettős festéssel. A respiráló mitokondriumokat festő MitoFluorRed minden mitokondriumot fest, tehát a preparátumban a sejtalkotók jól respirálnak. A zöld színű DAF-FM festék, amely specifikusan NO-t és származékait méri a mitokondriumok egy részét élénken festi. A B panelen a DAF-FM fluoreszcencia áramlási citométeres mérést mutatjuk be, látható hogy a NOS gátló L-NMMA nem csökkenti a jelet, míg az NO scavenger FP15 igen. A C panelen a hagyományos arginin konverziós esszé eredményei láthatóak, a NOS gátlószer L-NAME itt sem képes csökkenteni a jelet, amely arra utal, hogy az NO termelés nem NOS enzimen keresztül történik.

#### 4.2.2. Lehetséges, hogy a mtNOS azonos az eNOS-sal?

Több esetben is reprodukálhatóan kimutattuk, hogy egér máj mitokondriumokban egy 140 kDa méretű, eNOS immunoreaktív fehérjét lehet azonosítani Western blottal (11. ábra). Noha ez a fehérje hiányzik az eNOS knockout állatokban ezért szinte biztosan azonos a korábban kimutatott eNOS-sal, a mitokondriumokban a fehérje mennyisége jelentősen alacsonyabb, mint ugyanazon preparátum teljes szövet lizátumában, ezért minden bizonnyal citoplazmatikus kontaminációról van szó. A NOS aktivitás azonban, amelyet arginin-citrullin konverziós esszével mértünk hasonló értéket mutat mind a szövetben, mind a tisztított mitokondrium preparátumban (11. ábra). Az aktivitásért felelős enzim affinitás-tisztítás révén képesek voltunk koncentrálni (11. ábra). További kísérletek kimutatták, hogy a mitokondriális NOS aktivitás érintetlen eNOS knockout egerekben (n=6) és a fluoreszcens módszerrel mért NO termelés szintén kimutatható respiráló mitokondriumokban, amelyeket eNOS knockout egerekből izoláltunk (11. ábra).

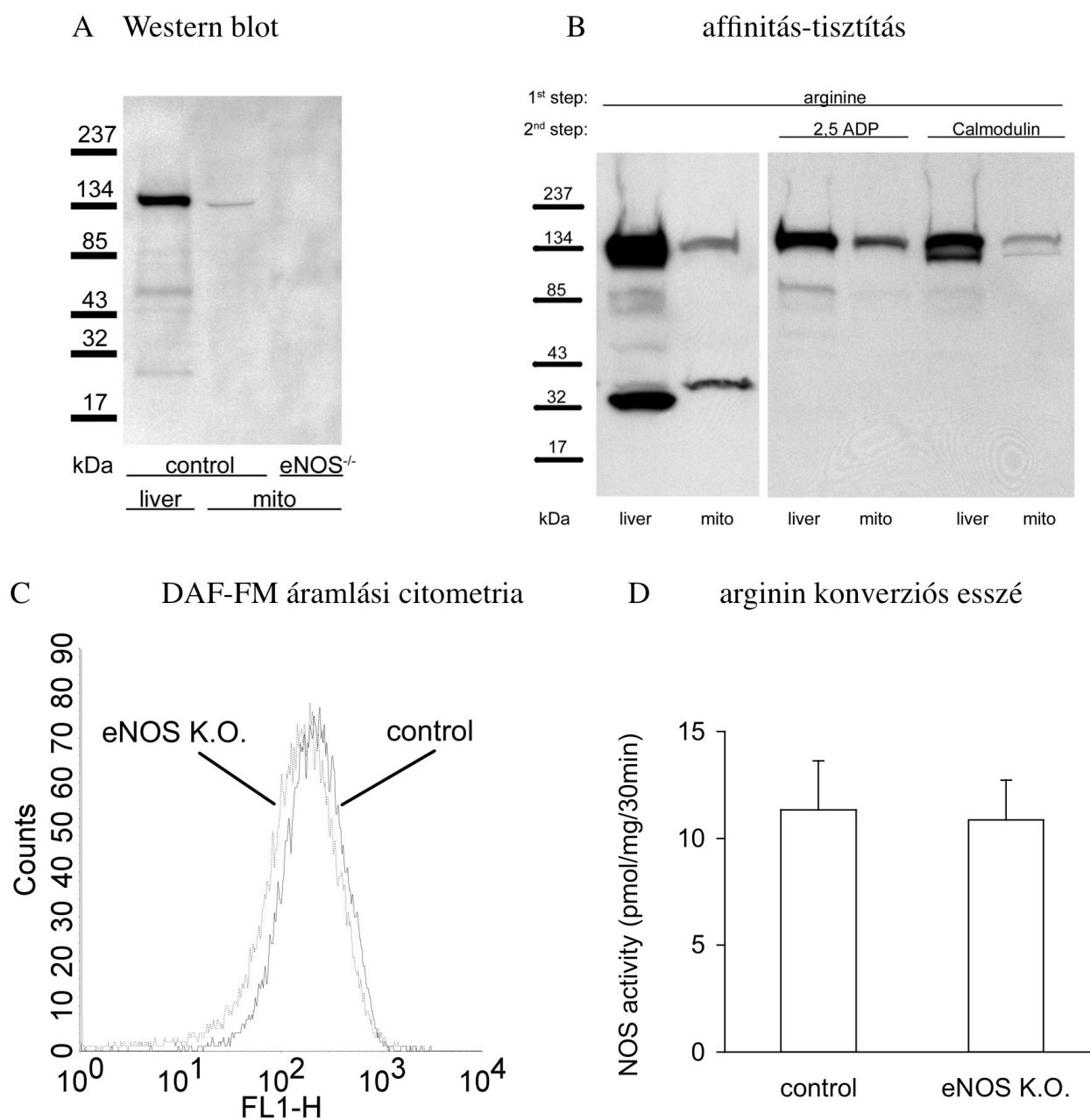
#### 4.2.3. Lehetséges, hogy a mtNOS azonos az nNOS-sal?

Elsőként nNOS immunoreaktív fehérjét kerestünk izolált mitokondriumokban Western blot technikával, de nem sikerült egyetlen specifikus jelet sem azonosítani, noha 7 különböző antitestet is kipróbáltunk. Természetesen a pozitív kontrollként szolgáló teljes agyszövet lizátumban minden antitest felismerte az ismert nNOS variánsokat (125-160 kDa), de ebben a molekulasúly tartományban nem találtunk mitokondriális fehérjét (12. ábra). Némely poliklonális anti-nNOS antitest, pl. SC-648 a Santa Cruz-tól, talált mitokondriumban dúsuló fehérjét, de ezek mind jelen voltak nNOS knockout állatokban. Továbbá ezen fehérjék egyikét sem ismerte fel egynél több nNOS antitest, amely valószínűtlenné teszi, hogy ezek a fehérjék közel állnának egy funkcionális nNOShoz. Ezután immunoprecipitáltunk nNOS antitest segítségével, majd Western blotot végeztünk más epitópok ellen termelt nNOS antitestekkel (12. ábra). Ahogy az ábrán látható, a módszer igen jól kimutatta a pozitív kontrollként szolgáló agyi nNOS-t, de mitokondriumokban nem talált semmit.

Más elvek alapján, az enzim szubsztrátja, azaz az argininhez való affinitás révén is koncentráltuk a potenciális mtNOS-t, amelyet szintén Western blot követett. Ezzel a módszerrel szintén jól lehetett koncentrálni az nNOS-t agyszövetből, de izolált máj mitokondriumokban nem mutatott ki specifikus fehérjét (12. ábra). A mitokondriális NOS aktivitást arginin-citrullin konverziós esszével is mértük, és azt találtuk, hogy a citrullin szint azonos a vad típusú és az nNOS knockout állatokból izolált mitokondriumokban (12. ábra). Hasonlóképpen, a respiráló mitokondriumok által termelt reaktív nitrogén gyökök mennyisége is azonos volt mindkét állattörzsben (12. ábra).

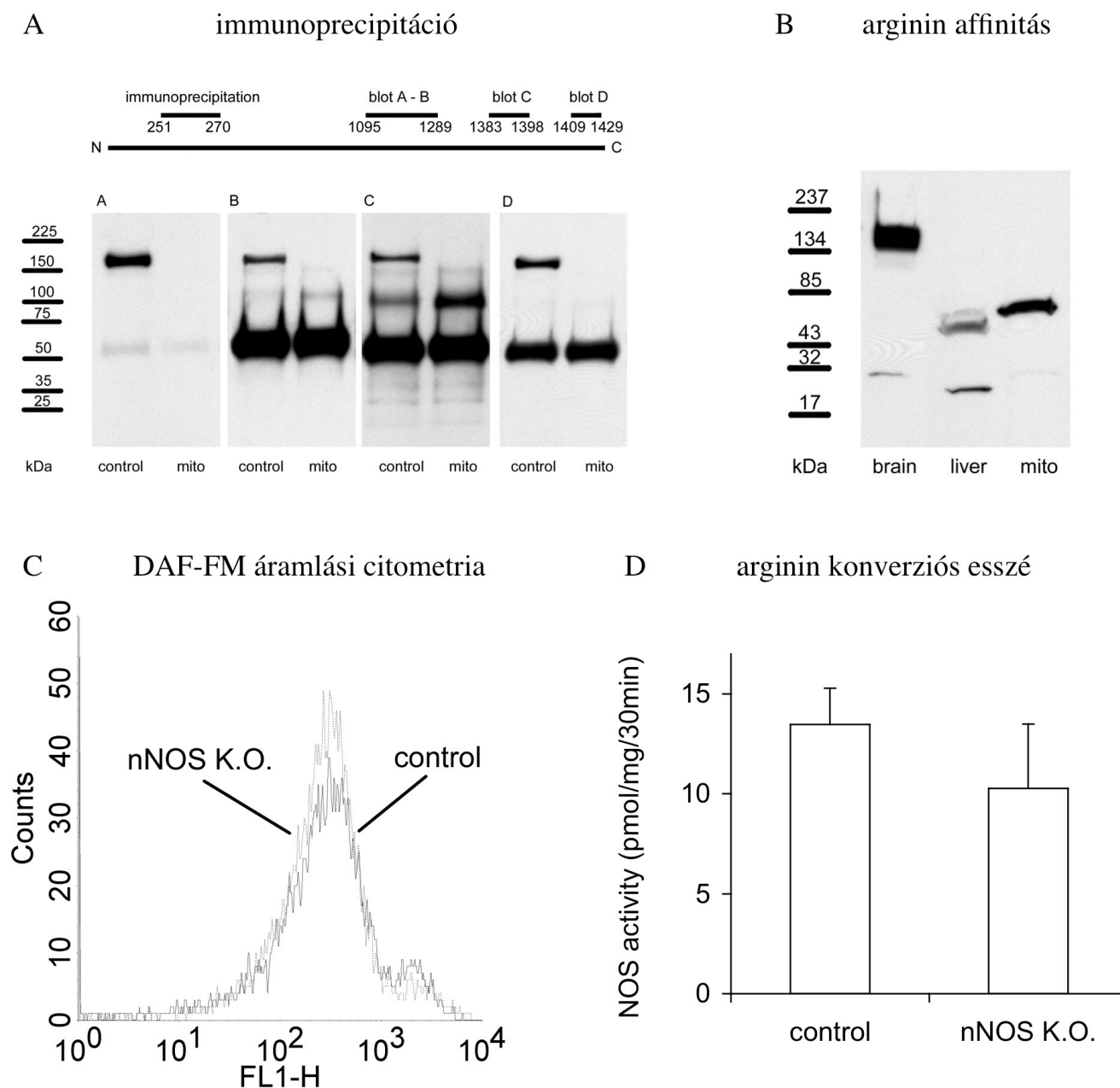
#### 4.2.4. Lehetséges, hogy a mtNOS azonos az iNOS-sal?

Western blotokat készítettünk anti-iNOS antitestek segítségével. Gyenge háttér és erős jel mellett a bloton jól felismerhető volt az iNOS pozitív kontroll (aktivált makrofág lizátum), de a máj mitokondrium mintákban nem találtunk jelet (13. ábra). A blotokat megismételtük további két, más-más epitóp ellen termelt iNOS antitesttel, hasonló eredménnyel. A mitokondriális NOS aktivitást az arginin-citrullin esszével mértük, amelyet nem volt képes gátolni a specifikus iNOS inhibitor 1400W (100  $\mu$ M, n=8) (13. ábra). Az iNOS knockout egerekből izolált mitokondriumokban ugyanolyan erős DAF-FM jelet észleltünk, mint a vad típusúakban konfokális mikroszkópiával és áramlási citométerrel is (15. ábra).

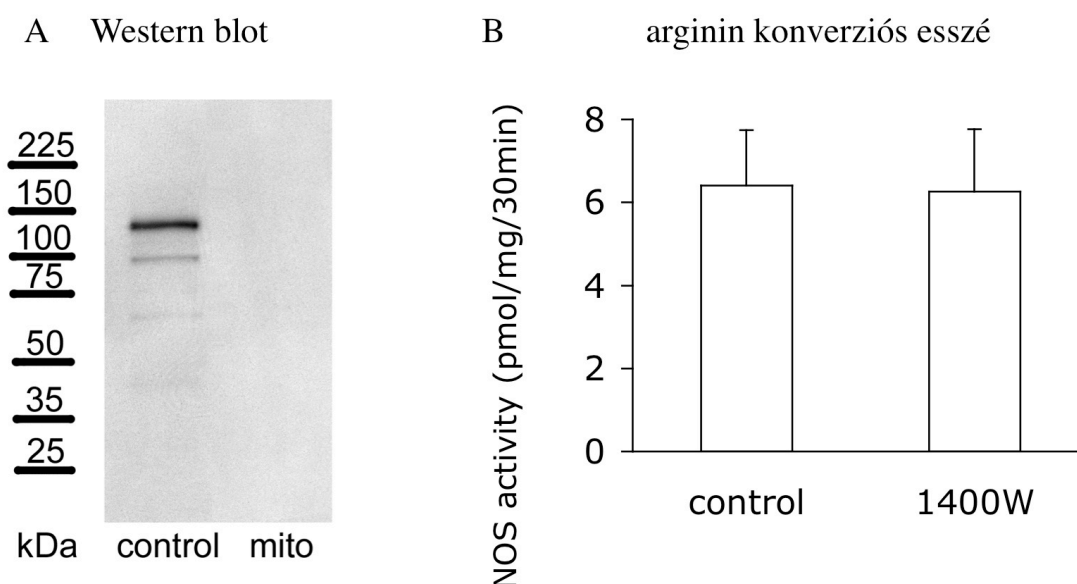


**11. ábra.** Az eNOS mint lehetséges mitokondriális NOS vizsgálata. Az A panelen Western blot látható izolált egér máj mitokondriumokkal. A vad típusú egér mitokondriumokban van egy gyenge jel 140 kDa körül, amely hiányzik az eNOS knockoutban. A B panelen szubsztrát és kofaktor affinitás alapján dúsítottuk a lehetséges mtNOS-t, majd eNOS ellen blottoltuk. Az első lépcsőben argininnel, majd utána a NOS kofaktorai, ADP vagy Calmodulin affinitás révén választottuk el a fehérjét. Egyetlen esetben sem dúsult a jel a mitokondriumokban, hanem kb. A mitokondrium preparálás tisztaságával azonos mértékben gyengült jelet adott, azaz a talált fehérje minden bizonnyal sejtmembrán kontamináció. A C és D paneleken DAF-FM fluoreszcenciát és NOS aktivitást vizsgáltunk vad típusból és eNOS knockout egérből izolált mitokondriumokon.





**12. ábra.** Az nNOS mint lehetséges mitokondriális NOS vizsgálata. Az A panelen immunprecipitáció és Western blot látható izolált egér máj mitokondriumokkal. Az első lépésben precipitáltunk, majd más-más epitópok elleni antitesttel blottoltunk. A mitokondriumokban nincsen érdemi jel. A B panelen arginin affinitás alapján dúsítottuk a lehetséges mtNOS-t, majd nNOS ellen blottoltuk, a mitokondriumokban nincsen 150 kDa körül specifikus jel. A C és D paneleken DAF-FM fluoreszcenciát és NOS aktivitást vizsgáltunk vad típusból és nNOS knockout egérből izolált mitokondriumokon.



**13. ábra.** iNOS jelenlétének vizsgálata egér máj mitokondriumokban. Az A panelen hagyományos Western blot látható, a mitokondriumban nem látható specifikus fehérje 130 kDa körül. A B panelen mitokondriális NOS aktivitás mérését ábrázoltuk arginin konverziós esszével. Az iNOS specifikus gátlószere, az 1400W nem csökkentette a mért jelet, tehát az arginin konverzió nem lehet az iNOS hatása.

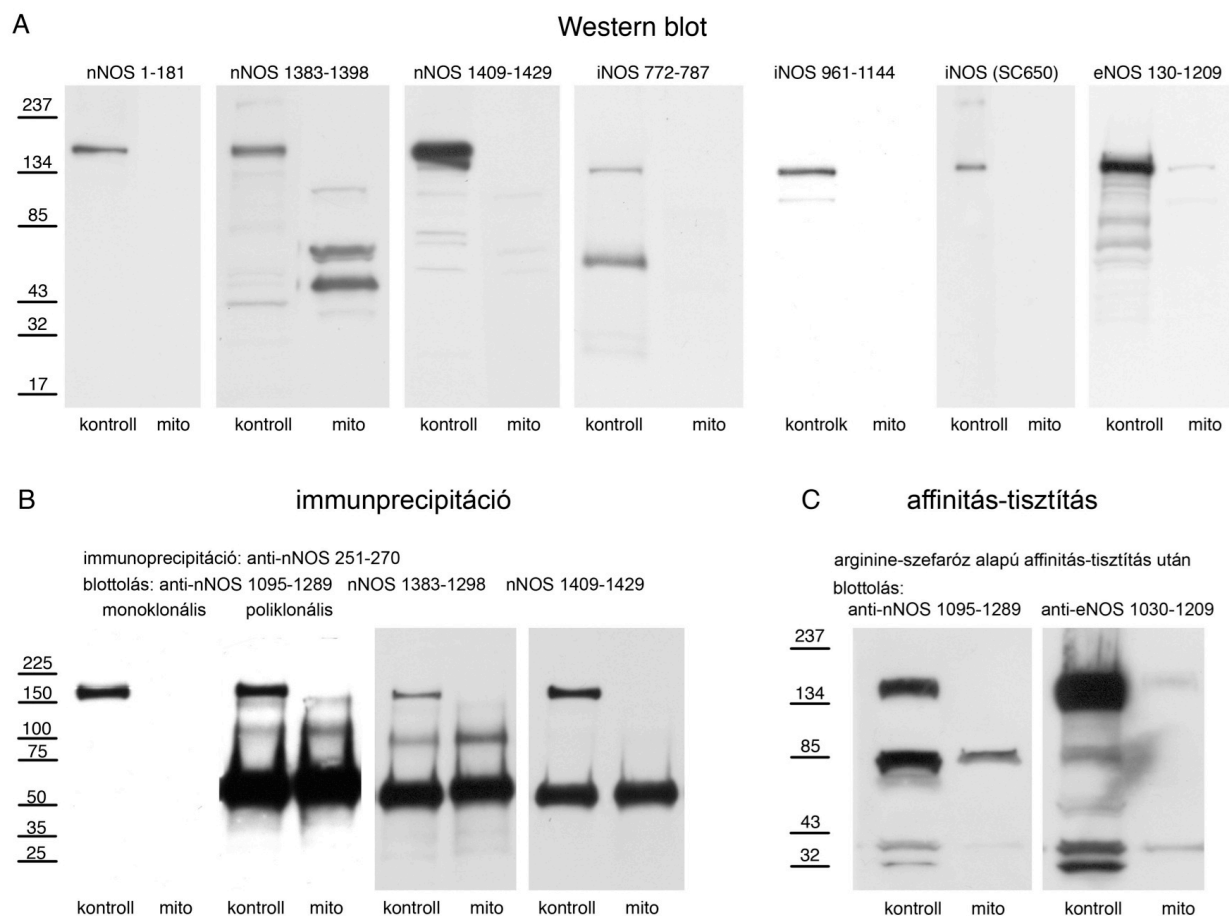
#### 4.2.5. mtNOS hiányának igazolása szívizom mitokondriumokban

Elsőként NOS-antigenitású fehérjéket próbáltunk azonosítani izolált egér szív mitokondriumokban Western blot technikával (14. ábra). Minden használt antitest jól felismerte a pozitív kontrollját, de specifikus mitokondriális jelet nem találtunk, az egyetlen kivétel az eNOS antitest esetében jelentkezett, ami egy halvány mitokondriális csík volt. Mivel azonban ennek a jelnek az intenzitása mindössze néhány százalákát teszi ki a teljes szövet lizátumban mért jelnek, ezért a mitokondrium preparátumban lévő citoplazmikus szennyezésnek tudható be. Mivel ez a megközelítés nem volt sikeres, immun-affinitás vagy szubsztrát-affinitás révén koncentráltuk a fehérjéket. Az ezt követő Western blotokon ismét erősen pozitív volt a várt kontroll, de a mitokondriumokban nem tudtunk kimutatni specifikus jelet (14. ábra). A fenti kísérletek egy részét megismételtük humán szívből izolált mitokondriumokon, amely hasonló eredményt adott (14. ábra).

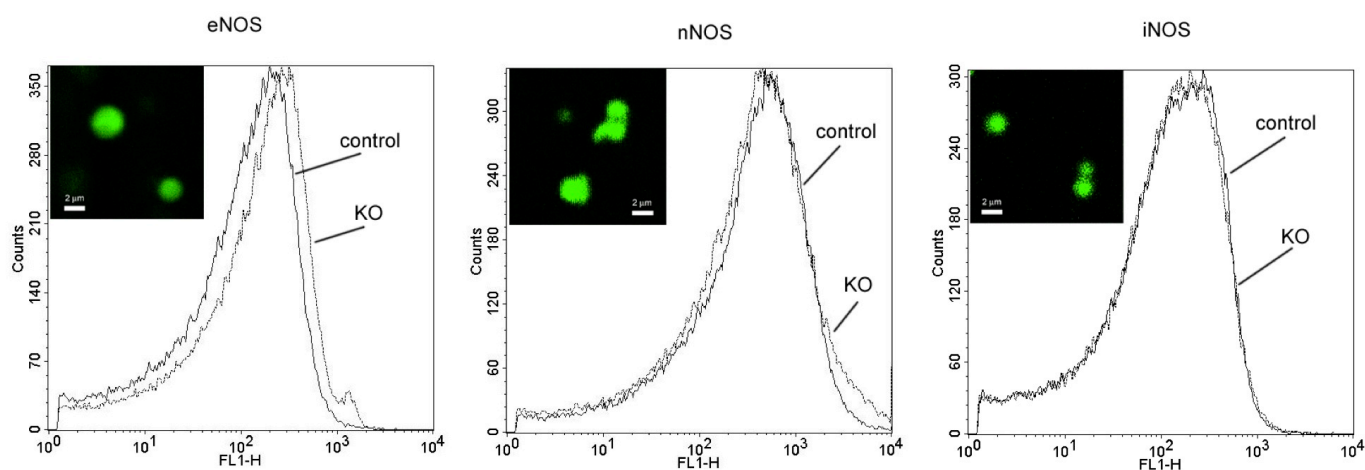
#### 4.2.6. mtNOS hiányának igazolása agyban

A két másik vizsgált szövethez hasonlóan kerestük a feltételezett mtNOS enzimet agyi mitokondriumokban is. Az agyszövetben erős NOS aktivitás mérhető, amelyért részben a neuronális izoforma, részben viszont az endoteliális eredetű NOS a felelős, ezért a mitokondrium preparátumok esetén az ezekkel való kontamináció ellenőrzésére kiemelt figyelmet kellett fordítani. A korábbiakhoz hasonlóan készítettünk Western blot alapú kísérleteket is, ezek nem voltak képesek kimutatni ismert NOS fehérjét az izolált egér agyi mitokondriumokban. Ezeket a kísérleteket a redundancia miatt a jelen dolgozatban részletesen nem tárgyalom, de természetesen a hivatkozott közleményekben megtalálható. Egyedül a fluoreszcens elven alapuló NO mérést emeltem be a jelen munkába, mivel ez átvezet a további vizsgálatokhoz.

Ahogy az a 15. ábrán látható, izolált respiráló mitokondriumok igen erősen festődnek az NO és nitrogén gyök érzékeny DAF-FM festékkel (specifitás méréseket lásd fentebb), amely jelen van mindhárom ismert NOS knockout egértörzsben is.



**14. ábra.** Ismert NOS izoformák azonosításának hiánya egér szív mitokondriumokban. Az A panelen hagyományos Western blotok láthatóak, minden blot egy pozitív kontrollt és egy izolált egér szív mitokondrium preparátumot tartalmaz. Az antitest neve mellett az antigén helyét tüntettük fel a primer szekvenciában. A B-panelen kétlépcsős vizsgálatot végeztünk, először immunprecipitáltuk az anti-nNOS antitesttel reagáló mitokondriális fehérjét, majd epitópok elleni nNOS antitestekkel blottoltunk. Jól látható minden ábrán a pozitív kontrollban az nNOS 150 kDa körül, míg mitokondriumokban csak aspecifikus, kis molekulású fehérjék reagálnak. A C panel hasonló kísérletet mutat be, amelyben arginin-szefarózzal kivontuk a lizátumokból a NOS szubsztrátjával, azaz az argininnel reagáló fehérjét, majd ezeket blottoltuk NOS ellenes antitestekkel. A mitokondriumokban szintén nem lehet felismerni specifikus fehérjét, míg a pozitív kontrollban igen.

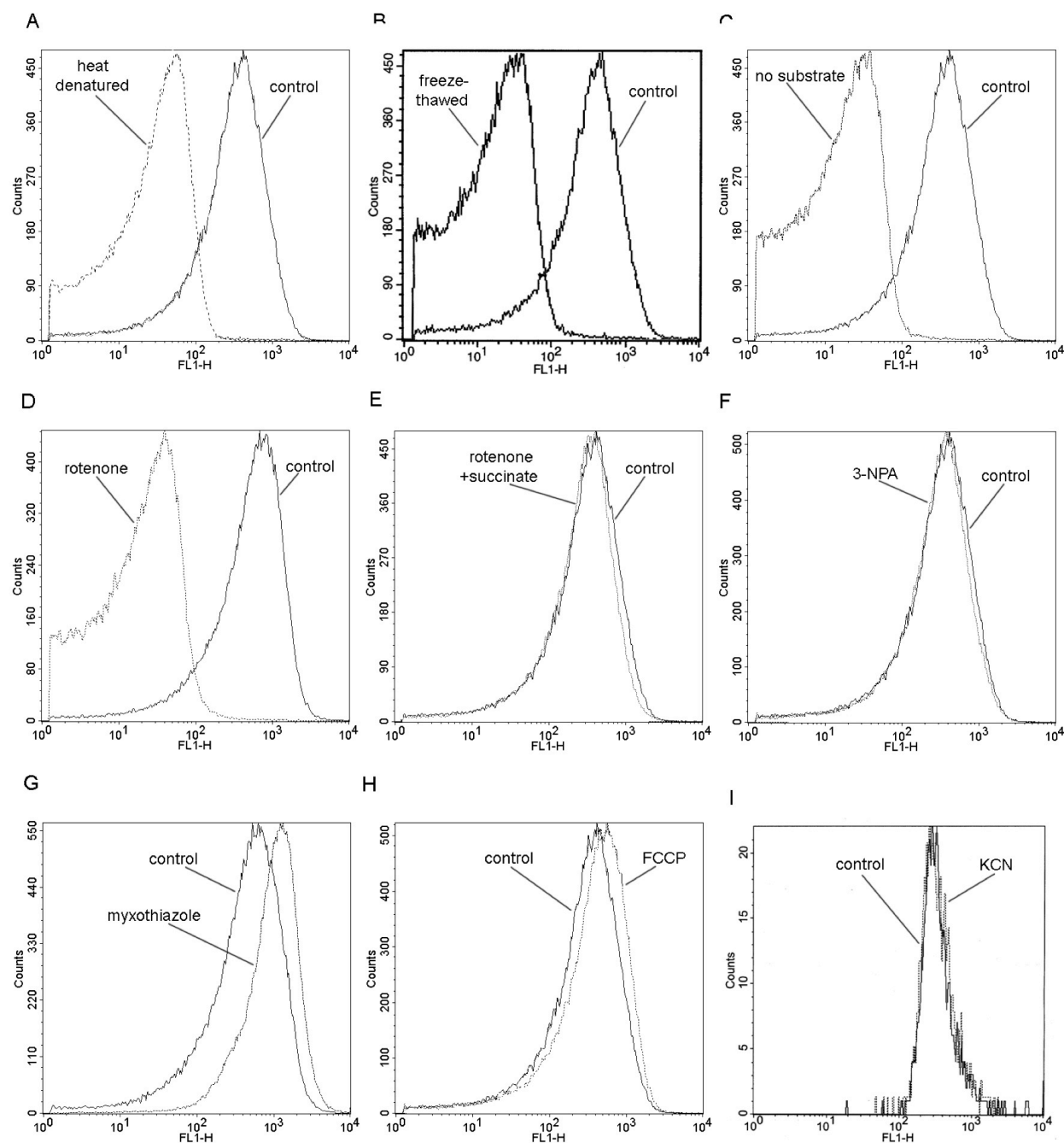


**15. ábra.** Ismert NOS izoformák azonosításának hiánya agyi mitokondriumokban. A mitokondriális NO és reaktív nitrogén vegyületek termelését DAF-FM-mel vizsgáltuk. A kis képeken konfokális fluoreszcens mikroszkópos kép mutatja, hogy a festék a mitokondriumokban dúsul, a hisztogrammok 100,000 mitokondrium mérésből kalkuláltak áramlási citométerrel. Jól látható, hogy bármelyik NOS izoformát üjtük ki genetikailag az egerekből, a fluoreszcens jel, azaz a mitokondriális reaktív nitrogén ágensek termelése változatlan marad.

#### 4.2.7. A respirációs lánc szerepe a mitokondriális NO termelésben

A fenti részletes megfigyelések rövid tanulsága az volt, hogy noha semmilyen módszerrel nem lehetett NOS enzimet kimutatni a mitokondriumokban, de minden esetben erős fluoreszcens jelet láttunk DAF-FM festékkel. Mivel ez a fluorofor nem kizárólag NO-t, hanem inkább nitráló ágensek együttesét méri, ezért feltehető, hogy a mitokondriumok által, de a NOS enzimreakciótól függetlenül termelt NO gyorsan más ágensekké, gyökökké alakul át. Mivel a mitokondriális légzési lánc szerepe ismert az oxidánsok termelésében, ezért megvizsgáltuk hogy a légzési lánc elemeinek gátlása hogyan befolyásolja a nitrogén tartalmú gyökök termelését.

A mitokondriális DAF fluoreszcenciát erősen gátolta, ha az organellumokat denaturáltuk háromszori fagyasztás-felolvasztás ciklussal, vagy a preparátum melegítésével (95 °C, 5) (16. ábra). Hasonlóképpen, a DAF fluoreszcencia teljes gátlását tapasztaltuk, amikor a légzést blokkoltuk rotenonnal, vagy egyszerűen a respirációs szubsztrátok glutamát és malát megvonásával (16. ábra). A II-es komplex gátlása 3-NPA (100  $\mu$ M) révén glutamát és malát jelenlétében nem volt képes gátolni a fluoreszcenciát, illetve szukcinát adása rotenton mellett is hasonló eredményt adott, ezzel azt igazoltuk, hogy akár az I-es, akár a II-es komplex képes elektron donorként szerepet játszani a reakcióban (16. ábra). Az ubiquinone oxidációs hely gátlása a III-as komplexen myxothiazole révén enyhén csökkentette a fluoreszcenciát, amely arra utal az ubiquinone pool szükséges a reakcióhoz. A IV-es komplex gátlása cianiddal, vagy a proton grádiens megszüntetése protonofór FCCP révén nem volt képes csökkenteni a fluoreszcenciát (16. ábra).



**16. ábra.** A légzési lánc szerepe a mitokondriális reaktív nitrogén gyökök termelésében. A gátlószereket a fluoreszcens festék adása előtt alkalmaztuk. Az A és B panel azt mutatja hogy fiziko-kémiai roncsolás után a mitokondriumok nem adnak DAF jelet, tehát a reakció biológiai aktivitást feltételez. Szubsztrát hiányában (C panel) vagy rotenon jelenlétében (D panel) szintén nincs jel, de ha rotenon mellett szukcinátot adunk akkor erős a DAF fluoreszcencia (E panel). A III-as komplex gátlása a szukcinát dehidrogenáz gátló 3-NPA (F panel) révén nem, de az ubiquinon oxidációs hely gátlása mixothiazollal (G panel) képes volt csökkenteni a fluoreszcenciát. A IV-es komplex gátlása vagy a proton grádiens megszüntetése (H és I panelek) nem gátolta a reaktív nitrogén gyökök termelését.

#### 4.2.8. A DLDH komplex aktiválása nitroztatív stressz által és a következményes PARP-jellegű aktivitás fokozódás

Western blot analízis segítségével kimutattuk, hogy az anti-PAR antitest több mitokondriális fehérjét is jelöl oxidatív-nitroztatív stressz, azaz  $H_2O_2$  vagy GSNO kezelés után. A PAR-ilácó erősebb volt a mitokondrium preparátumokban mint teljes májszövet homogenizátumokon, amely arra utal, hogy a mitokondriális fehérjéket erősen befolyásolja az oxidatív stressz által okozott PAR-iláció. A két-dimenziós gél elektroforézis és Western blot szintén kimutatott több fehérjét, amelyek  $H_2O_2$  kezelés hatására PAR-álódtak (17. ábra). Noha több fehérjét is láttunk a blotokon, az ezüsttel festett gél és megfelelő anti-PAR Western blot összehasonlítása révén nagy biztonsággal csak 4 fehérjét tudtunk izolálni, amelyeket tömegspektrometria segítségével azonosítottunk. Ezek a fehérjék a következők voltak: mitokondriális aldehyd dehidrogenáz (gi|16073616, MW: 48271 Da, pI: 6.1, mtALDH),  $H^+$ -transzportáló 2-szektoros ATP-áz béta lánc (gi|92350 ,MW: 50771 Da, pI: 4.9, ATPáz), ornitin transzkarbamiláz (gi|56789151, MW: 39574 Da, pI: 9.2, Otc) és a mitokondriális karbamoil foszfát szintetáz -1 (gi|8393186, MW: 164581 Da, pI: 6.3, CPS1). A fehérjéket a következő peptidek "post source decay" adatai alapján tudtuk azonosítani: mtALDH: VVGNPFDSR és TFVQEDVYDEFVER, ATPáz: IGLFGGAGVGK és VLDSGAPIKIPVGPETLGR, Otc: SLVFPEAENR és CPS1: FLEEATR.

Ezen fehérjék mindegyike jelentős szerepet játszik a mitokondriális homeosztázisban. Az ATPáz-t és az mtALDH-t gátolja az oxidatív stressz, az Otc-nek csökken a szintje, míg a CPS1 az oxidatív stressz hatására kikerül a mitokondriumból irodalmi adatok szerint.

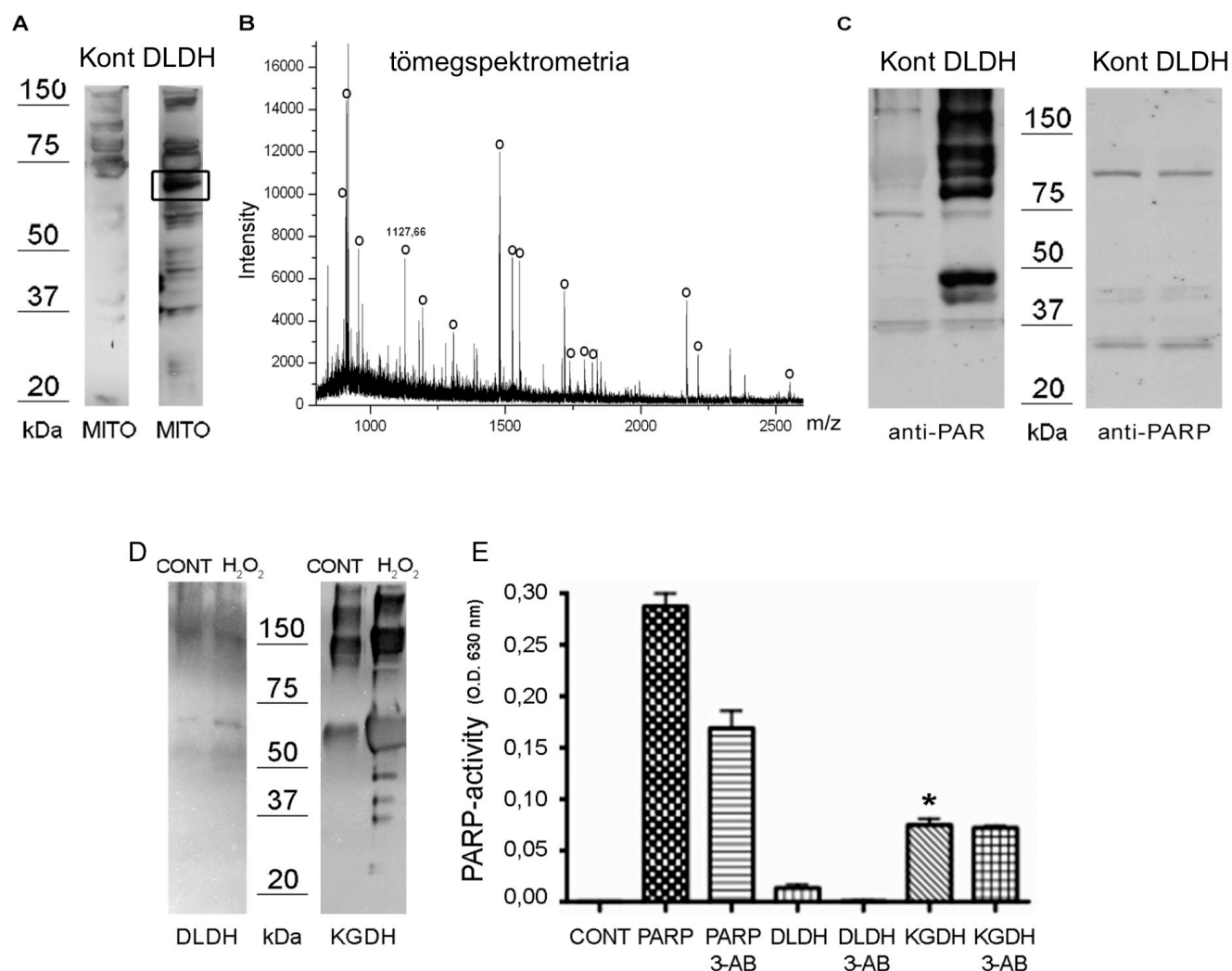
A GSNO-val kezelt mitokondriumokban PAR-álódott fehérjéket is kimutattuk Western blot segítségével. Egy erőteljesen festődő, GSNO által PAR-ált 70 kDa méretű fehérjét kivágtunk a Coomassie-val festett gélből és tömegspektrométerrel analizáltuk. A kérdéses fehérjét egyértelműen a mitokondriális dihidrolipoamid dehidrogenázként (DLDH-ként) identifikáltuk (gi|38303871, MW: 54574 Da, pI: 7.96), amely az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz



enzimrendszer része. A fehérjét a következő peptidek "post source decay" adatai alapján tudtuk azonosítani: ALTGGIAHLFK és GIEIPEVR. Tretter László és munkatársainak kutatásai alapján a KGDH komplexet szintén gátolja az oxidatív stressz (217, 218). Mivel a DLDH ugyanazt a szubsztrátot használja, mint a PARP, és erőteljes PAR-ilációt mutat nitroztatív stresszre szintén a PARP-hoz hasonlóan, azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a DLDH-nak lehet intrinzik PARP aktivitása.

A mitokondriumokat rekombináns DLDH-val inkubáltuk, amely erőteljes PAR-ilációval járt, viszont PARP-ellenes antitestekkel nem tudtunk kimutatni érdemi PARP enzimet. Az izolált DLDH és KGDH enzimek saját PARP aktivitását úgy mértük, hogy a tisztított fehérjéket együtt inkubáltuk  $H_2O_2$  -dal 30 percig  $37^\circ C$ -on  $NAD^+$  és  $FAD^+$  jelenlétében pH 7.5 pufferben. A  $H_2O_2$  kezelés egy új PAR-ilált fehérje csíkot mutatott  $\sim 70$  kDa környékén a DLDH csoportban, illetve több további fehérjét is a KGDH csoportban (17. ábra).

Egy kolorimetriás PARP enzimesszé használatával nem tudtunk kimutatni PARP aktivitást amikor csupán DLDH volt az oldatban, de mérhető aktivitást mutatott a teljes KGDH komplex, amelynek a DLDH is tagja. A klasszikus PARP gátlószer 3-aminobenzamide gátolta az ismert PARP enzim aktivitását, de nem volt hatással a KGDH által mutatott PARP-jellegű enzimaktivitásra (17. ábra). A mitokondriális mintákat különböző oxidatív-nitroztatív stresszt kiváltó szerek, így  $H_2O_2$  vagy NO donorok (GSNO, SNAP) jelenlétében inkubálva további PAR pozitív fehérjéket találtunk. A DLDH ismert gátlószere a MICA (5-methoxyindole-2-carboxylic acid) megszüntette ezen PAR-iláció kialakulását.

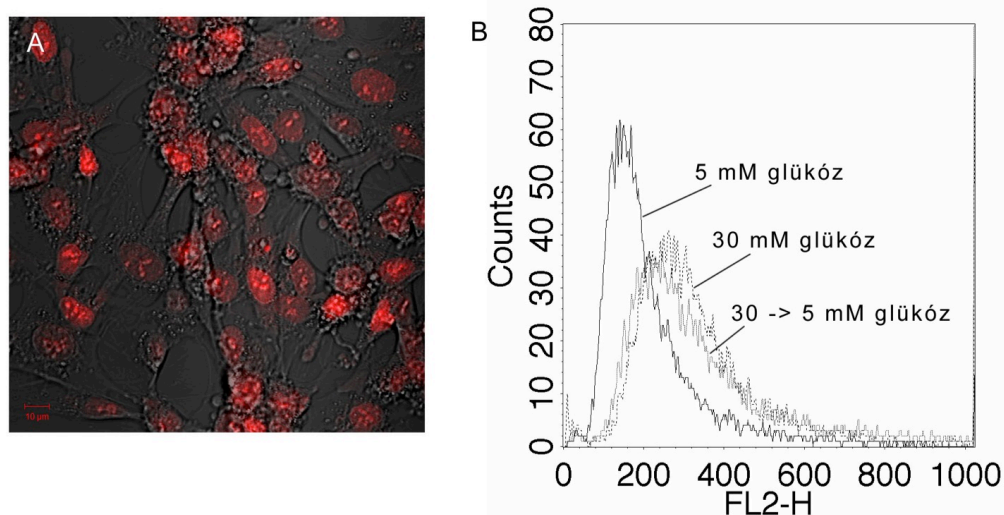


**17. ábra.** A DLDH mitokondriális PARP-jellegű enzimaktivitást mutat. Izolált, respiráló mitokondriumok 3 mM GSNO hatására egyes fehérjék PARálódnak, a legerősebben jelölt fehérjét (A panel, keretben) a tömegspektrometria (B panel) mint a DLDH enzimet azonosította. Mitokondrium izolátumok, hozzáadott rekombináns DLDH enzim jelenlétében igen erős PARP aktivitást mutatnak, azaz megemelkedik a PAR-antitesttel reagáló fehérjék mennyisége (C panel, bal oldali blot) anélkül, hogy a sejtmagi PARP- enzimmel reagáló antitest megnövekedett jelet adna. Rekombináns DLDH enzim hidrogén peroxiddal való inkubáció után enyhén erősebb PAR-festést mutat 70 kDa körül, ez a reakció sokkal kifejezettebb a teljes enzimkomplex, azaz a DLDH-t is magába foglaló KGDH komplex esetében (D panel). Az E panelen PARP enzimaktivitás mérés eredménye látható. A pozitív kontrol PARP enzim erős aktivitást mutat, amely részlegesen gátolható 3-aminobenzamiddal (3-AB). A DLDH enzim önmagában csekéyl, a KGDH komplexben viszont számottevő PARP aktivitással rendelkezik, amely azonban nem gátolható 3-AB-vel (átlag  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0.05$ ).

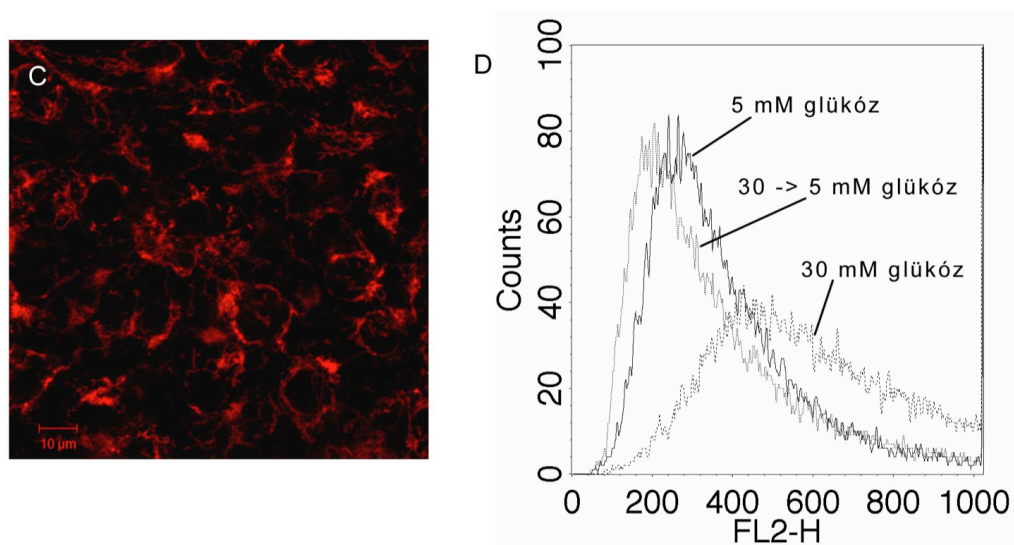
#### 4.2.8. Mitokondriális és sejtmagi szabadgyök termelés ingadozó cukorszintben

Az ingadozó cukorszint modellben tenyésztett sejtekben a felszabaduló szabadgyökök, oxidánsok mennyiségét fluoreszcens módszerekkel mértük. A lokalizációt konfokális mikroszkópiával, a kvantifikációt áramlási citometriával végeztük. Az oxidált hidroetidin és az oxidált MitoTrackerRed egymástól jól elkülöníthetően, kizárólagosan a magban illetve a mitokondriumban volt látható, ezért alkalmasak voltak a két helyen történő oxidáns termelés izolált vizsgálatára. Az endoteliális oxidáns tartalom mind a magban, mind a mitokondriumban emelkedett volt azokban a sejtekben, amelyeket 5 helyett 30 mM glükóz tartalmú oldatban tenyésztettünk (18. ábra). Azokban a sejtekben viszont, amelyeket két hétig magas glükóz tartalmú oldatban tartottunk, majd a mérés előtt egy héttel visszahelyeztük alacsony glükóz tartalmú oldatba az emelkedett oxidáns termelés csak a magban volt jelen, a mitokondriumokban visszatért a kontroll szintjére (18. ábra). A sejtek fizikai tulajdonságai (pl. side-scatter vagy forward-scatter) illetve morfológiája nem mutatott különbséget egyik vizsgált csoportban sem (18. ábra).

## Sejtmagi szabadgyök tartalom



## Mitokondriális szabadgyök tartalom



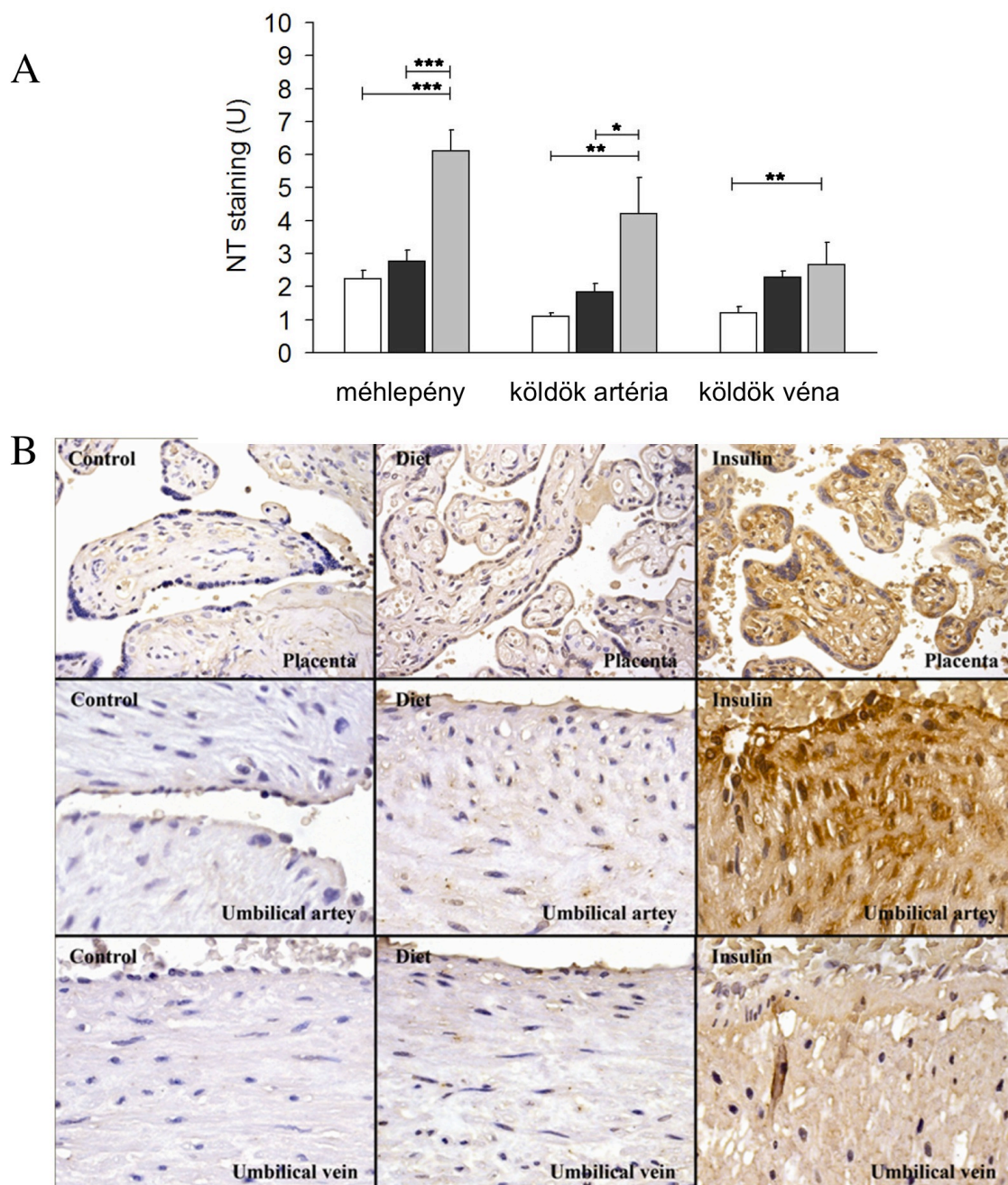
**18. ábra.** Mitokondriális és sejtmagi szabadgyök termelés ingadozó cukorszint hatására. Az A panelen hidroetidinnel festett sejtek mikroszkópos képe látható, a B panelen ugyanezen festék áramlási citometriával mért hisztogramja. Jól látható, hogy a magas cukorszint emeli a fluoreszcencia értéket, de nincsen különbség az ingadozó és a tartósan magas cukorszint hatása között, azaz hiába normalizáljuk a cukorszintet, a sejtmagi szabadgyök szint emelkedett marad. A C panelen egy mitokondriumokban dúsuló, szabadgyök-érzékeny festékkel festett sejtek láthatóak, a festék egyértelműen a mitokondriumokra lokalizálódik. A D panelen az ábrázolódik, hogy a tartósan magas cukorszint ugyan emeli a mitokondriális szabadgyök termelést, de ha visszacsökkentjük a cukorszintet a normálisra, akkor a szabadgyök mennyiség is normalizálódik.

#### 4.2.9. Nitroztatív stressz terhességi cukorbetegségben

Terhességi cukorbetegségben vizsgáltuk az oxidatív-nitroztatív stressz sejten belüli hatásait a terhesség lefolyása során illetve szüléskor az anyai és magzati szövetekben. A tirozin nitráció, azaz a nitroztatív stressz fehérjékre gyakorolt nitráló hatásának markere emelkedett volt anyai keringő leukocitákban a 36-40. héten a kontrollnak tekinthető 16-29. héthez képest mind egészséges, mind gesztációs diabéteszes anyákban. Érdekes módon az inzulin kezelés a súlyosabb diabéteszes esetekben csökkentette a nitrotirozin festést a terhesség utolsó 4 hete idején. A nitroztatív stressz downstream hatása, azaz az emelkedett PARP aktivitás még korábban volt kimutatható a leukocitákban gesztációs diabéteszes betegekben, amelynek oka valószínűleg az lehet, hogy a nitrotirozin festés, mint marker érzékenysége alacsonyabb, mint a PARP aktivitásé, amely egy pozitív visszacsatoláson alapul. Az inzulin kezelés a PARP aktivitást is csökkentette az utolsó hetekben. Érdekes megfigyelés volt, hogy néhány beteg, akinél a terhesség korai szakaszában kiugróan magas PARP aktivitást láttunk, de a cukorbetegség paraméterei mérsékeltek voltak, később mindig súlyosbodó és végül inzulinra szoruló gesztációs diabéteszes beteg lett.

A szülés során szövettani mintát vettünk a méhlepény és a köldökzsinór szöveiteiből. A tirozin nitráció jelzetten emelkedett volt a diétával kezelt méhlepény szövetben és a köldök artériában, vénában diétával kezelt, tehát enyhe fokú gesztációs diabéteszben. Ezzel szemben a súlyosabb, ezért inzulin kezelésre szoruló betegekben igen erős nitrotirozin festést láttunk mindhárom szövettípusban (19. ábra). A nitrotirozinhoz hasonlóképpen, a PARP aktivitás markereként értelmezhető PAR festés szignifikánsan magasabb volt már az enyhe fokú diétával kezelt betegekben is, de igen kifejezett volt az inzulinos betegekben.





**19. ábra.** Nitrozatív stressz terhességi cukorbetegségben. Az A panelen a nitrotirozin ellenes festés intenzitását hasonlítjuk össze egészséges (fehér), diétával kezelt enyhe (fekete), és inzulinnal kezelt súlyos (szürke) terhességi cukorbetegségben a szülés után a méhlepényből vett mintákon. A B panelen reprezentatív képeken mutatjuk be az immunhisztokémiai festést. Megfigyelhető, hogy jelzetten a diétás esetekben, de kifejezetten az inzulinnal kezelt súlyos cukorbetegségben igen erős a fehérjék nitráltsága mindhárom vizsgált szövetben.

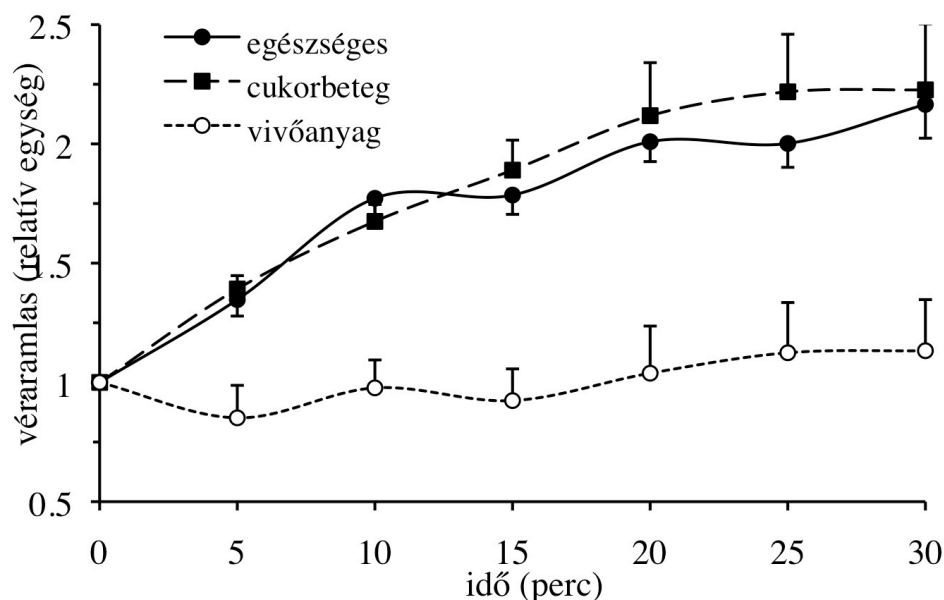
#### 4.2.10. Nitrogén-monoxid donorok szerepe diabéteszes láb szindrómában

Elsőként a lokális vazodilatátor hatását vizsgáltuk különböző GSNO koncentrációknak. Sem a vehikulum, sem az alacsonyabb GSNO koncentráció nem emelte a véráramlást patkányok talpbőrében, de magasabb GSNO dózis adására már 10 perc után szignifikánsan emelkedett az áramlás, amely magas maradt a vizsgálat 30 perce alatt. Ez a hatás hasonló mértékű volt egészséges és cukorbeteg patkányokban is (20. ábra).

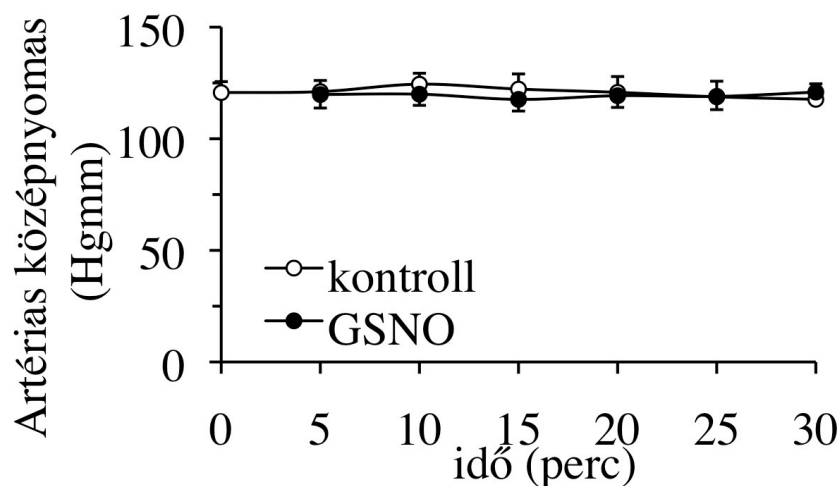
Vizsgáltuk a GSNO alkalmazás várható mellékhatásait is. Az a GSNO dózis, amely jelentős véráramlás fokozódást okoz, nem növelte vagy változtatta meg a bőrszövet nitrotirozin mintázatát (20. ábra). Szisztémás akut hatások tekintetében azt várhatjuk, hogy a keringésbe jutó GSNO vagy a belőle leadott NO általános vazodilatációt, vérnyomáscsökkenést vagy szívfrekvencia fokozódást okoz. A jelen kísérleti felállásban ezek egyikét sem tapasztaltuk.

A

## GSNO kezelés hatása a véraramlásra

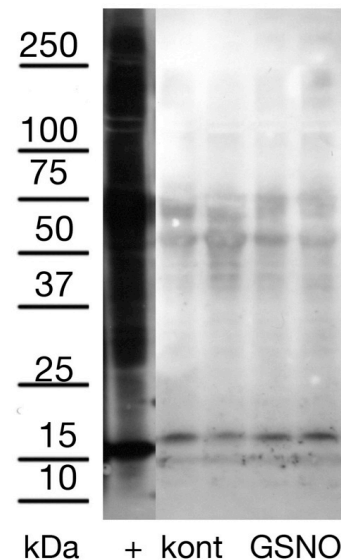


B



C

## Nitrotirozin mintázat



**20. ábra.** Nitrozóglutation kezelés hatása és lehetséges mellékhatásai diabéteszes állatmodellben. Az A panelen a patkányok talpbőrén mért mikrocirkulációt ábrázoltuk lokális GSNO kezelés alatt. Megfigyelhető, hogy a cukorbeteg állatokban sem csökkent az értágító reakció. A B panelen az állatok vérnyomását monitoroztuk, amely nem változott lokális GSNO kezelés hatására. A C panelen egy várható lokális mellékhatást, a bőrfehérjék nitrotirozin reakcióját vizsgáltuk. Míg a pozitív kontrollban igen erős a jel, addig GSNO hatására sincsen nitrotirozin jel fokozódás.

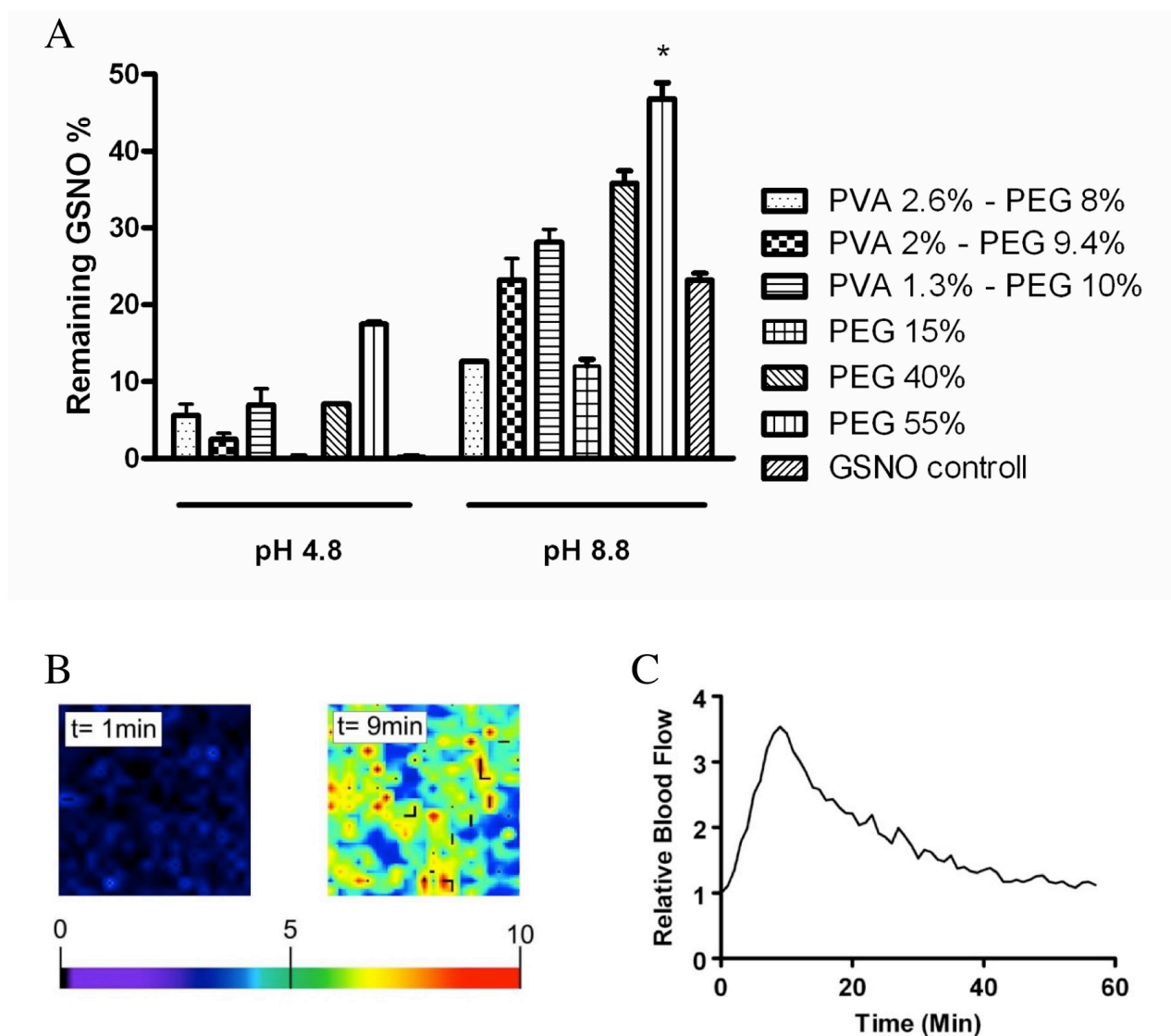


#### 4.2.11. Stabil, a gyógyászatban is alkalmazható GSNO formuláció fejlesztése

A fenti kísérletek sorozata azt mutatta, hogy a nitrozótiolok, elsősorban a GSNO központi szerepet játszik a mitokondriális NO metabolizmusban. Azt is kimutattuk, hogy külsőleg NO donorként alkalmazva még cukorbetegség által érintett szövetekben is képes emelni a helyi véráramlást szisztémás hatások nélkül. Mivel a GSNO egy endogén vegyület, metabolizmusa jól ismert, ezért gyógyszerként való alkalmazásakor kicsi az esélye toxikus vagy egyéb nem várt mellékhatásoknak. Gyors bomlása miatt azonban megfelelően stabil formulációja nem ismert, ezért terápiásan nem is alkalmazható. A további kísérletekben azt tűztük ki célul, hogy GSNO hatóanyag kémiai megváltoztatása nélkül egy megfelelő topikális készítményt állítsunk elő.

A nitrozótiolok szintézise a redukált forma (pl. GSH) és  $\text{NaNO}_2$  reakciója révén lehetséges vizes oldatban. Azt találtuk, hogy erősen savas (pH 1.6) környezetben a konverziós ráta közel maximális, 99.5%-os. A GSNO szintézise után a molekula stabilitását vizsgáltuk 7 nap után, 4 °C-on különböző pH mellett. Meglepő módon a GSNO igen gyorsan bomlott savas környezetben, alig  $6.7 \pm 0.1\%$  GSNO maradt meg 1 hét után 0.3-as pH-n. Ezzel szemben enyhén bázikus környezetben a stabilitás az 50%-ot is elérte, majd ismét lecsökkent magasabb pH-n. Az optimális pH tartomány 8.4 és 8.8 között volt, ahol a 14 napos tárolás során  $28.1 \pm 4.6\%$  és  $31.8 \pm 4.6\%$  GSNO maradt meg (21. ábra). A tárolás során a pH minden preparátum esetében csökkent, amely arra utal, hogy a bomlás során egy savmolekula jön létre. Ez a megfigyelés polimer mátrix környezetben is fennállt, azzal a különbséggel, hogy bizonyos cukor polimer kompozíciók jelentősen meg tudták hosszabbítani a GSNO stabilitását, amely hatás additív volt a pH módosítás hatásával (21. ábra).

A GSNO stabilitásának növelése épp a biológiai aktivitás ellen hat, mivel az NO leadása lassul. Ezért megvizsgáltuk, hogy a stabilabb GSNO formulációk képesek-e a bőr mikrocirkulációjának javítására. Negyven mM GSNO-t tartalmazó gél egészséges önkéntesek alkarjára helyezve tranziens, az alkalmazás helyére lokalizált véráramlás-emelkedést okozott, amelyet lézer doppler szkennelrel mértünk (21. ábra).



**21. ábra.** GSNO formuláció és hatása a humán mikrocirkulációra. Az A panelen stabilizáló polimerek és a pH hatásait vetjük össze. Minden polimer adalék stabilizálta a GSNO vegyületet, de a pH hatása ennél összességében jelentősebb mértékű volt. A B panelen nyugalmi és GSNO alkalmazása utáni mikrocirkuláció felvételt láthatunk emberi alkar bőrfelületen. A hamis-színes skála mutatja az erőteljes áramlás emelkedést, amelyet a C panelen időfüggésben ábrázoltunk.

### 4.3. Sejterápia szubcelluláris mechanizmusai

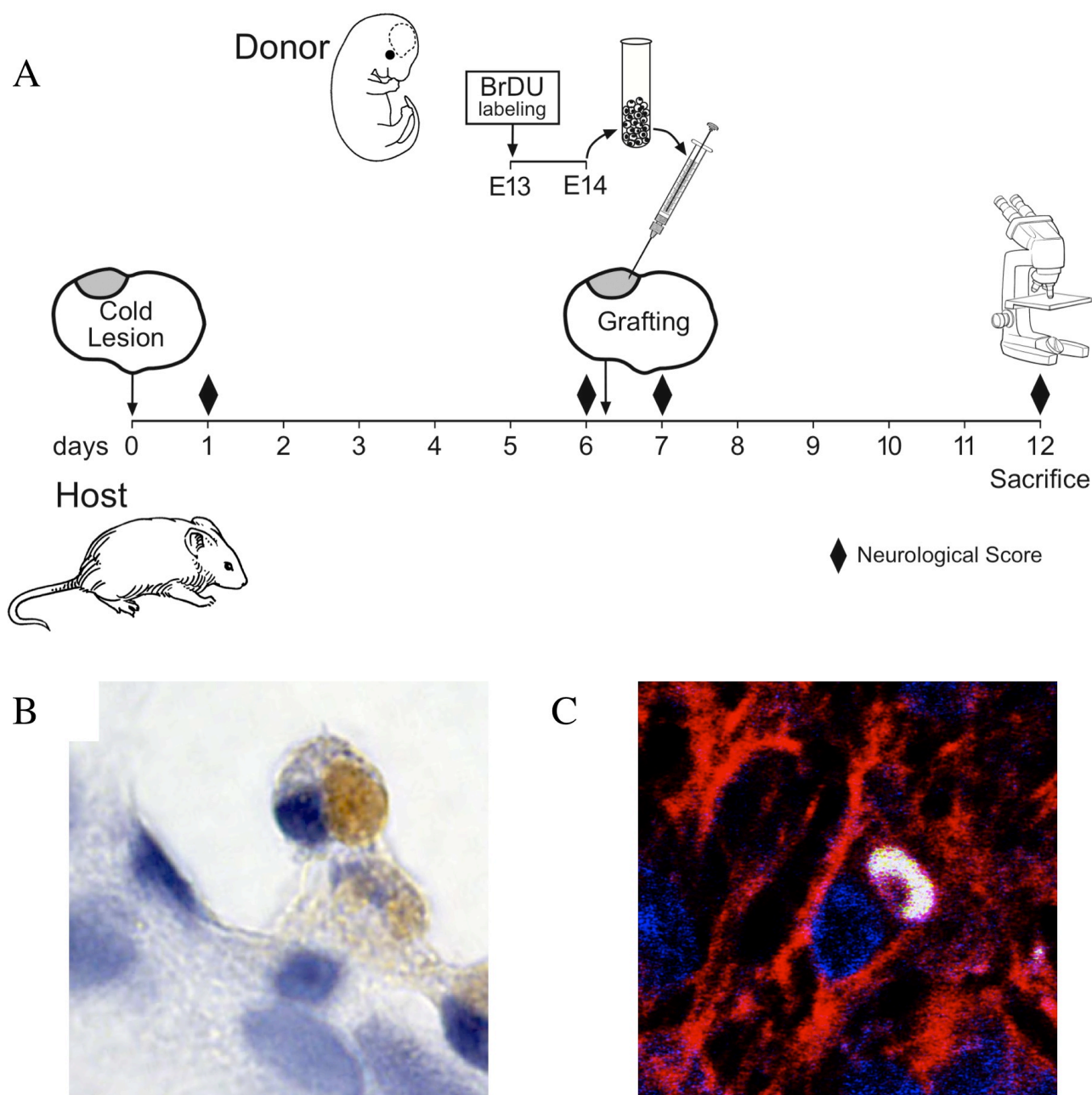
#### 4.3.1. *In vivo* őssejt átültetés hideglézióban.

A frissen izolált sejtekből kenetet készítettünk és immuncitokémiát végeztünk. A donor sejtek 26%-a volt pozitív BrDU-ra, azaz minden negyedik sejt volt jelölve a beültetés markerével. Az őssejt marker nestin a sejtek 34%-ban volt jelen, amely arra utal, hogy a sejtek jelentős része egy igen korai differenciációs fázisban volt. Egy gyenge, diffúz GFAP festés is megfigyelhető volt, amely azonban nem tűnt specifikusnak, tehát ez alapján nem valószínű, de lehetséges, hogy a sejtek astroglia irányba kezdtek differenciálódni.

Hat nappal a graft beültetése után a jelzett sejteket megtaláltuk a lézió penumbra részén, illetve az agyfelszínen (22. ábra). A sejtek egy kisebb csoportja pozitívan festődött az asztroglia marker GFAP-vel, de nem találtunk érdemben pozitív sejteket sem az oligodendrocita marker MBP-re sem a neuron marker NF68-ra. Néhány sejt viszont (12 sejt 1874-ből 5 állatban) kétmagvú volt, amelyből csak az egyik volt BrDU pozitív (22. ábra).

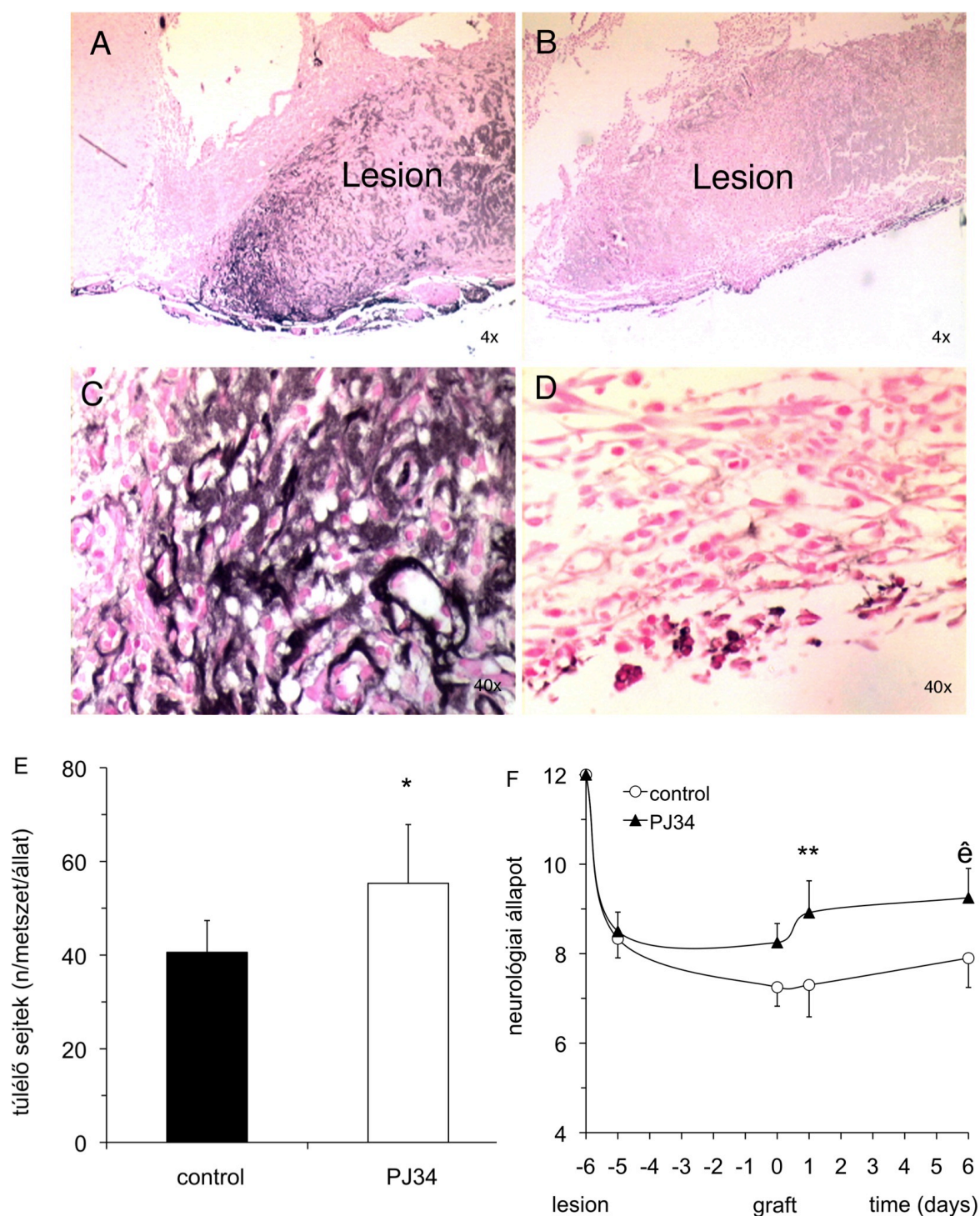
#### 4.3.1. A nitrozatív stressz gátlása növeli az átültetett sejtek túlélését

A nitrozatív stressz markereként használt nitrotirozin immunhisztokémia kimutatta, hogy agyi lézió után 2 nappal erős, 6 nappal viszont már csak gyenge nitrozatív stressz van jelen az agyban, amely elsősorban a lézió penumbra részén mutatható ki (23. ábra). A 6. napon átültetett sejtek további 6 nappal később megtalálhatóak voltak a penumbrában és az agyfelszínen a lézió területén. A túlélő beültetett sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a PARP gátlószer PJ34-gyel kezelt állatokban (23. ábra). Az állatok neurológiai státusza szintén jobb volt ebben a csoportban, amely meglepő módon már a beültetést követő napon jelentkezett.



**22. ábra.** Idegi őssejt átültetés protokollja (A panel). A kísérlet kezdetén (0. nap) hidegléziót hozunk létre a patkány parietális lebenyén, majd 6 nap múlva frissen izolált patkány embrionális idegi őssejt szuszpenziót adunk a penumbrába. A 12. napon az állatokat leöljük, a szöveteket perfundáljuk és paraffinos metszeteket készítünk. Az állatok neurológiai deficitjét az 1, 6, 7, és 12 napokon mérjük. A B panelen hematoxilinnel festett (kék) metszeten látható egy kétmagvú beültetett sejt, amelynek DNS-ét BrDU-val jelöltük (barna). A C panelen háromszoros festéssel látható egy kétmagvú sejt, az asztrocita marker GFAP piros, a sejtmagok festése kék, míg a beültetett sejtmagok jelölése zöld (együttesen fehér).



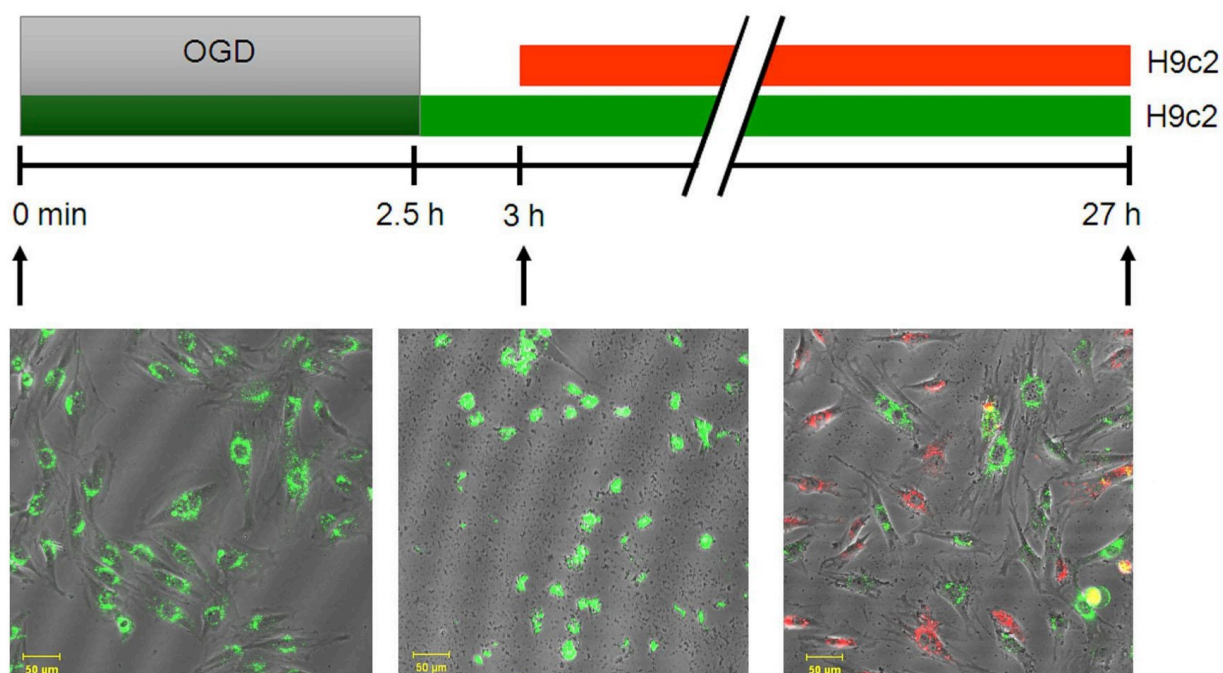


**23. ábra.** Nitrozatív stressz gátlásának hatása a beültetett sejtek túlélésére. Nitrotirozin festéssel látható kis nagyítással a patkány agy parietális kérgé, erős fehérje nitroziláció látható a lézió széli zónájában 2 nap után (A, C) amely jelentősen lecsökken 6 nappal a lézió után (B, D). A PARp gátló PJ34 adása a beültetés utáni első héten szignifikánsan növelte a sejtek túlélését (E) és meglepő módon még az állatok neurológiai státusza is javult a kezelés hatására (F).

#### 4.3.3. *In vitro* iszkémia és összejt átültetés modell

Az oxidatív-nitrozatív stressz és az összejt átültetés kölcsönhatásának vizsgálatát sejtszinten nemigen lehet vizsgálni *in vivo* állatmodellben, különösen ha a beültetés körüli graft-host kölcsönhatásokra vagyunk kíváncsiak. Az eddigiekben tárgyalt *in vivo* eredmények viszont épp arra utalnak, hogy a beültetés után rövid idővel, azaz még az érdemi differenciáció és regeneráció előtt is képesek az összejtek javítani a funkcion, illetve hogy a sejtfúzió egy ritka, de kimutatható történés szintén a korai szakaszban. Ezen jelenségek vizsgálatára dolgoztunk ki egy *in vitro* iszkémia és összejt beültetés modellt.

Patkány kardiomioblaszt sejtvonalon (H9c2) oxigén és glükóz megvonásával indukáltunk léziót, amelyet az összejt transzplantáció modelljeként egészséges sejtek hozzáadása és együtt tenyésztése követett. A teljes kísérletet olyan kamrában végeztük, amely a konfokális mikroszkóp tárgyasztalán helyezkedik el, és lehetővé teszi a teljes folyamat lekövetését fluoreszcens markerekkel (24. ábra). Az OGD ideje részben függött a vizsgált sejt típusától, H9c2 sejtek esetében a 150 perces OGD volt optimális, amely után 24 órával a sejtek hozzávetőleg fele elpusztult. Négy-hat órával a sejtek hozzáadása után az összejtek még nem teljesen tapadtak le a tenyésztő felületre, 48 óra múlva viszont a tenyészet túlnőtt a konfluencia határon, ezért a kísérleteket 24 óra elteltével analizáltuk.



**24. ábra.** In vitro iszkémia modell protokollja. Sejtenyészetben az oxigén és glükóz megvonásával 2,5 óráig iszkémiát szimulálunk (OGD), majd visszaadjuk a sejteknek a normál médiumot és oxigén tenziót. 30 perccel később friss, egészséges sejteket adunk a tenyészethez, amellyel együtt inkubálva a károsodott sejteket a korai transzplantációt modellezzük. A két sejtpopulációt külön-külön membrán festékekkel előre megfestjük, így követni lehet az egyes sejteket és a közöttük való kapcsolódásokat.

#### 4.3.4. Össejtek hozzáadásának hatása OGD-n átesett kardiomioblasztokhoz

Konfokális mikroszkópia és áramlási citometria egyaránt azt mutatta, hogy az OGD-n átesett sejtek jelentős része elpusztult 24 órával a lézió után (25. ábra). Egészséges MSC-k hozzáadására a H9c2 sejtek sokkal kisebb hányada volt halott, mint sejtek hozzáadása nélkül (24. ábra). Természetesen a két sejtpopulációt különböző színű fluoreszcens markerekkel jelöltük (Vybrant DiD, Dil vagy DiO), és ezért nyomon tudtuk követni a sérült sejtpopulációt. Amennyiben a két sejtpopulációt egy szűk lyukméretű háló választotta el egymástól, de ugyanabban az oldatban voltak tenyésztve, ez a megmentő hatás nem érvényesült, noha mindkét sejtpopuláció ugyanolyan denzitást és morfológiát mutatott, mint együtt-tenyésztés közben (25. ábra). Ez arra utal, hogy a megmentő hatáshoz mindenképpen szükséges a sejtek direkt kontaktusa.

#### 4.3.5. Sejt-sejt kapcsolatok vizsgálata

Sejt-sejt közötti kapcsolatok sokféle módon kialakulhatnak. A közelmúltban leírt nanotubulusok, azaz vékony membránhidak, amelyek tranziens sejt-sejt kapcsolatot hoznak létre jól megfigyelhetően voltak az általunk vizsgált sejt típusok között is. Ezek a nanotubulusok több sejt szélességnyi teret voltak képesek áthidalni, a sejtekkel együtt vándoroltak, és vastagságuk 200 és 500 nm között volt (26-27. ábra). MitoTrackerRed festés kimutatta, hogy gyakran respiráló mitokondriumok voltak ezekben a csövekben, amelyek lassan vándoroltak egy irányban. Videomikroszkópiás megfigyelések alapján azt találtuk, hogy ezen nanotubulusok létrejöttének és fennállásának időtávja 2 óra.

Egy másik típusú direkt sejt kapcsolat a sejtfúzió. A 24 órás együtt tenyésztés után igen sok sejt volt kettősen jelölt, azaz mindkét sejtpopuláció membrán markerét hordozta, de ezek között csak kevés volt két vagy többmagvú (25. ábra). Igen ritkán le tudtunk filmezni egyértelmű sejtfúziót, amely két, eltérően jelölt sejt között jött létre. Mindenesetre a sejtfúzió ritkasága és a kettősen jelölt sejtek nagy száma között erős a diszkrepancia, ezért feltételezhető, hogy részleges fúzió, vagy akár membrán elemek cseréje a

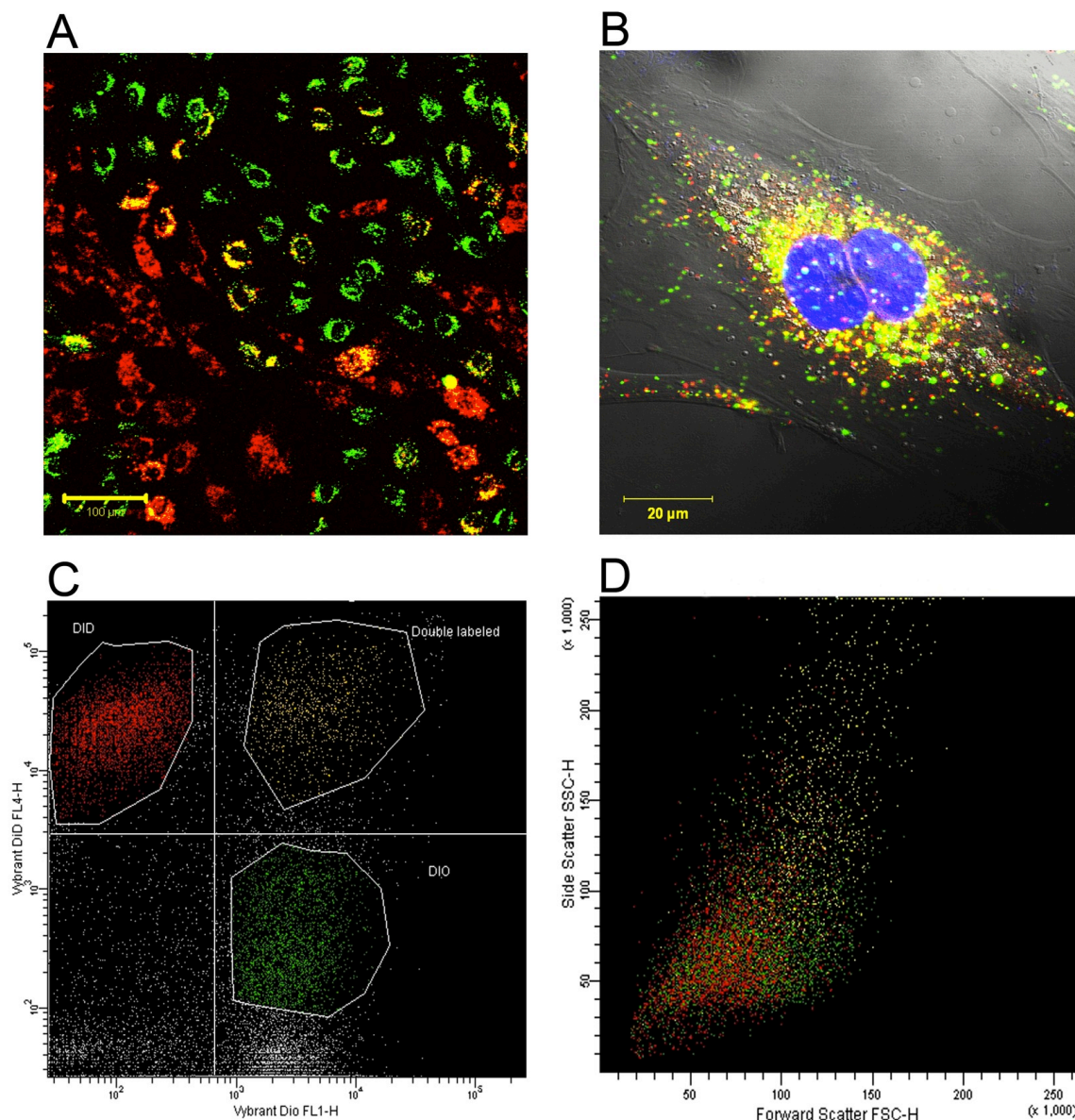


nanotubulusok kapcsolódási pontjain lehet a magyarázat. A technikai fals pozitív festések kizárására részletes kísérleteket végeztünk, amelyek eredményét egy módszertani könyvfejezetben publikáltuk, ennek részletes ismertetése azonban meghaladja a jelen dolgozat kereteit.

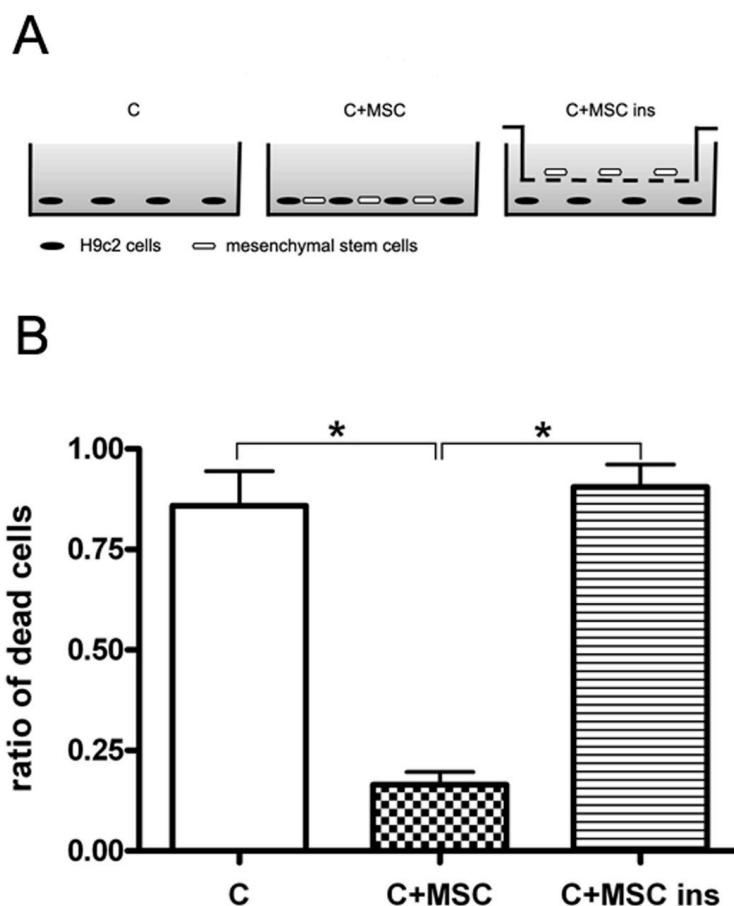
#### 4.3.6. Mitokondriumok szerepe a megmentő folyamatban

Mivel azt figyeltük meg, hogy a sejthidakban mitokondriumok vándorolnak, feltételeztük, hogy a mitokondriumoknak szerepük lehet a megmentő hatás létrejöttében, vagy akár egyik sejtől a másikba is vándorolhatnak. Elsőként a mitokondriális funkciót vizsgáltuk. Amennyiben a mitokondriális respirációt irreverzibilisen gátoltuk F16-tal azokban a sejtekben, amelyeket megmentőként alkalmaztunk, a várt hatás nem jött létre. Egy másik módszerrel, a mitokondriális DNS károsításával is megismételtük a kísérletet, hasonló eredménnyel. Ebben az esetben a megmentő sejteket 6 hétig előkezeltük etídiom-bromiddal, amely szelektíven károsítja a mitokondriális DNS-t és ez a sejten belül a mitokondriumok degradációjához, majd eltűnéséhez vezet, de a sejtek életképesek maradnak glikolízis segítségével.

Kimutattuk tehát, hogy sejthidak jelenléte szükséges a megmentő hatás érvényesüléséhez, továbbá a sejthidakban mitokondriumok vándorolnak, illetve a mitokondriumok károsítása gátolja a megmentő hatás létrejöttét, tehát kézenfekvő a kérdés, hogy a mitokondriumok transzfere a megmentő sejtekből a ledált sejtekbe áll-e a mechanizmus hátterében. A sejteket ezért transzsfektáltuk zöld illetve piros fluoreszcens fehérjét tartalmazó, a mitokondriumba targetált fehérje szekvenciákkal, így a két populáció mitokondriumai külön-külön színnel voltak jelölve, amely marker egyszerű fizikai membránkapcsolat révén nem tud átolldódní. Az ezeken a sejteken végzett kísérletek kimutatták, hogy az OGD-n átesett és egészséges sejtek együtt tenyésztése során a mitokondriumok fizikailag nem jutnak át egyik sejtől a másikba, azaz mitokondriális transzfer nem szükséges a megmentő hatás létrejöttéhez (27. ábra).

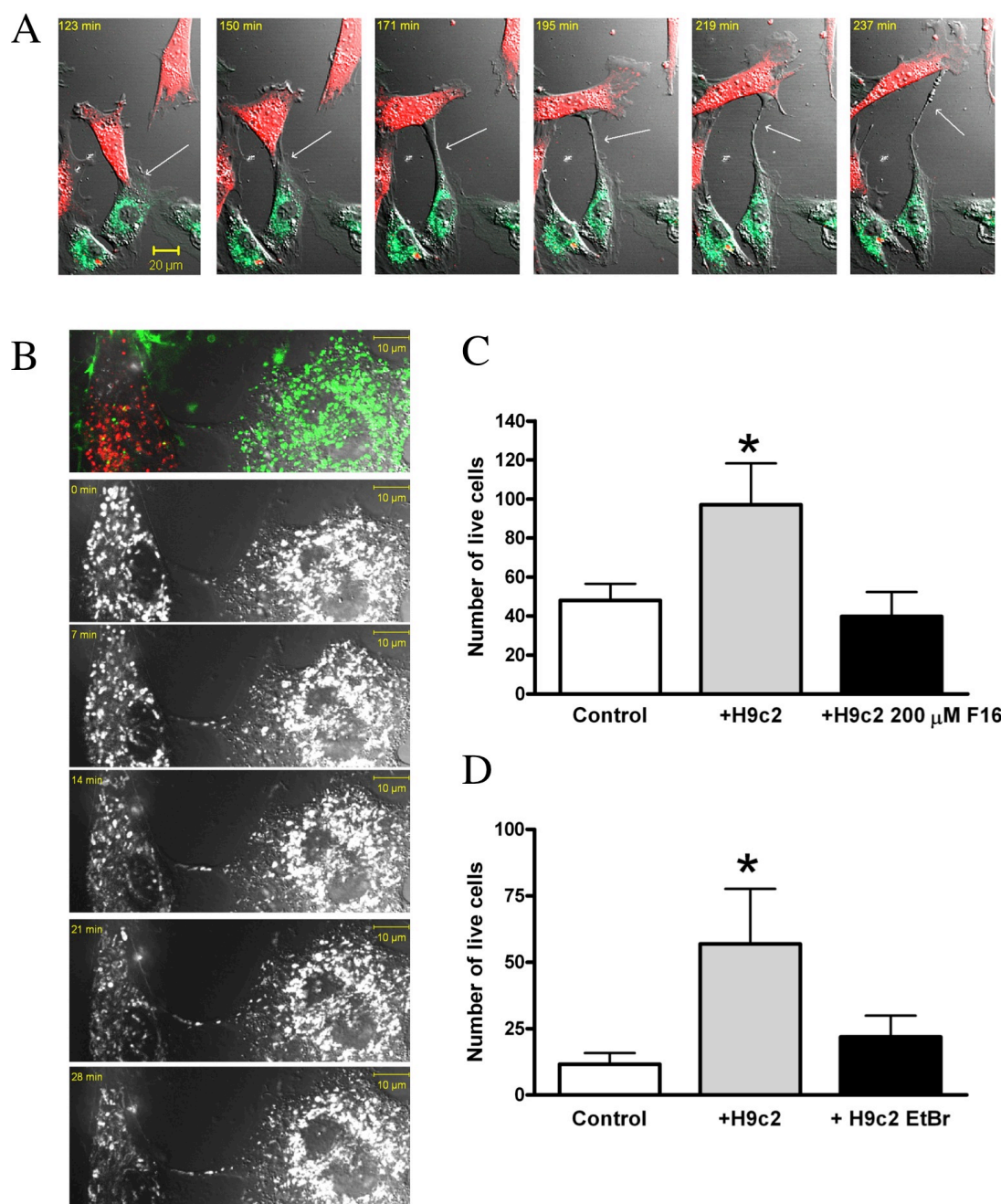


**25. ábra.** Két sejtpopuláció kölcsönhatása 24 órával az iszkémia és sejt-hozzáadás után. A károsodott sejteket piros, a megmentő sejteket zöld festékekkel jelöltük. Az A panelen reprezentatív konfokális mikroszkópos kép látható, amelyen jól elkülöníthetők a kétféle festékekkel jelzett sejtek, de van egy harmadik, kettős festésű (sárga) sejtpopuláció is. A B panelen egy ilyen kettősen jelölt sejt látható, amelynek magja is kettőzött (kék), ezért valószínűleg fúzió eredménye. A C panelen áramlási citometriás képen ábrázoltuk a sejttenyészetet, a zöld, piros és sárga populációk jól elkülönülnek, igazolva azt, hogy a festék átjutása nem passzív kémiai átoldódás, hanem valamilyen irányított folyamat. A D panelen ábrázolt scatterplot mutatja, hogy a sárga színű sejtek a magasabb fényszóródást mutató, azaz nagyobb méretű sejtpopulációban helyezkednek el, de az elkülönülés itt inkább csak jelzés szerű.



**26. ábra.** A hozzáadott sejtek megmentik az iszkémián átesett sejteket. Az A panelen a kísérlet sematikus ábrázolása látható. A kontroll csoportban (C) csak H9C2 kardiomioblaszt sejteket tenyésztettünk, amelyek több mint háromnegyede elpusztult 24 órával a lézió után (B panel, első oszlop). A második csoportban mezenhimális őssejteket adtunk a tenyészetbe az iszkémia után (C+MSC), amely azt eredményezte, hogy az eredeti károsodott populációban a halott sejtek aránya erősen lecsökkent (B panel). Amennyiben a megmentő sejteket egy hálóra ültettük, ezért nem voltak képesen közvetlen sejtkontaktusba lépni a károsodott sejtekkel, a megmentő hatás elmaradt, ezzel azt igazolva, hogy az oldatba szekretált esetleges parakrin faktoroknak nincsen számottevő hatása ebben a kísérletben (C+MSC+ins).





**27. ábra.** Nanotubulusok és mitokondriumok szerepe a megmentő folyamatban. Az A panelen a két sejtpopuláció között kialakuló vékony membránhidakat ábrázoltuk. Az idősoron jól megfigyelhető, hogy a két sejt mozgása során a kapcsolat fixen rögzül a membránon, és követi a sejtek távolodását egymástól. A B panelen mitokondriális festéssel tettük láthatóvá a nanocsöveket, az idősoron (a jobb kontraszt miatt fekete-fehérben) látható hogy mitokondriumok vándorolnak a nanocső belsejében. A C panelen az OGD után 24 órával éltben lévő sejtek számát ábrázoltuk önmagukban, megmentő sejtek jelenlétében, illetve olyan megmentő sejtekkel amelyek mitokondriális funkcióját gátoltuk (F16 vagy EtBr által, részletek a szövegben).

## 5. Diszkusszió

Eredményeink alapján elmondható, hogy noha eléggé szerteágazó irányokba indulva igyekeztünk az iszkémiás károsodás új terápiás célpontjait azonosítani, minden esetben a mitokondriumok központi szerepére bukkantunk. Az ATP-függő kálium csatornák esetében a farmakológiai eredmények vezettek rá több kutatócsoportot is, hogy a markáns prekondíciós hatás nem a sejtfelszíni, hanem a mitokondriális  $K_{ATP}$  csatornákon keresendő, ezért fókuszáltuk a saját kutatásokat is ennek a csatornának az azonosítására. A nitrozatív stressz vizsgálata során a mitokondriumok, mint az NO egyik fő effektor helye kerültek a vizsgálat középpontjába, innen jutottunk el a mitokondriális NO termelés molekuláris mechanizmusainak vizsgálatához. Ebben a kísérleti ágban ahogy haladtunk a klinikailag releváns kutatások felé úgy kerültünk egyre távolabb mitokondriumoktól, de ennek a kutatásnak az eredménye vezetett egy új gyógyszerformuláció kifejlesztéséhez, amely mégiscsak az orvosbiológiai kutatások végső célja. A sejterápiás kísérleteket elsősorban az iszkémiás károsodás és sejterápia celluláris mechanizmusainak vizsgálatára terveztük, amelynek feloldóképessége térben, időben éppen elegendő volt a mitokondriumok szintjén való mérésekhez. Korábban ilyen szemmel senki nem közelítette meg a sejterápiát, talán ezért is lehet hogy elsőként írtuk le a mitokondriumok kötelező szerepét a sejt-sejt kontaktusok révén való hatásmechanizmusban.

### 5.1. Mitokondriális ATP-függő kálium csatornák szerepe iszkémiában

Ahogy a dolgozat eredmények fejezetében szerepelt, 4 különböző módszerrel is megvizsgáltuk a lehetséges Kir és SUR alegységek jelenlétét agyi mitokondriumokban (22). Elsőként a Kir 6.1, 6.2 és SUR-1 illetve SUR-2 alegységek primér szekvenciájából, amelyet a Swissprot adatbázisból nyertünk, megvizsgáltuk, hogy a mitokondriumba targetáló szekvenciát tartalmaz-e. Azt találtuk, hogy mind a Kir 6.1 mind a 6.2 alegységek rendelkeznek az N-terminálison mitokondriális transzport szekvenciával, míg a SUR-2 esetében egy

más pozícióban találtunk ilyen target tag-et. A SUR-1 esetében nem volt semmilyen ilyen jellegű szekvencia, azaz igen kicsi az esélye, hogy a SUR-1 fehérje a sejten belül a mitokondriumba lenne irányítva. Másodikként BODIPY-glibenclamide kötés révén kimutattuk, hogy a mitokondriumok szulfonilurea kötéssel rendelkeznek asztrocitákban és neuronokban - azaz vannak funkcionális szulfonilurea receptorok (SUR-ok) a mitokondriumokon. A glibenclamide hatását nemcsak SUR-kötés révén, hanem funkcionális mérésekkel is igazoltuk, hiszen a glibenclamide hatását visszafordította a diazoxide, a BMS-191085, vagy a kálium ionofór nigericin. Harmadikként, immunogold jelöléssel kimutattuk, hogy az agyi mitokondriumokban Kir6.1 és SUR-2 antitestekkel specifikus kötést találtunk. Ezzel szemben a Kir6.2 és SUR-1 antitestek nem mutattak mitokondriális lokalizációt. Negyedikként Western-blotok révén azt találtuk, hogy a Kir 6.1 és SUR-2 jelen van, de a Kir 6.2 és a SUR-1 nem. A Kir6.1 csík molekulásúlya 50 kDa körüli, amely egyezik más kutatók által leírt molekulásúllyal (1, 2, 38). Ezzel szemben a SUR-2 antitesttel két kisebb méretű, SUR-2 immunoreaktív csíkot találtunk 30 és 130 kDa, amelyek a mitokondriumokban dúsultak, illetve egy 175 kDa méretű fehérjét találtunk teljes agyszövetben, amely a mitokondriumokban nem volt jelen. Nem tisztázott, hogy a kisebb fehérjék degradációs termékek-e vagy önálló mitokondriális variánsok. Bajgar és munkatársai kimutattak egy (1) 64 kDa méretű mitokondriális SUR-t, míg Szewczyk és munkatársai (27) egy 28 kDa-os agyi mitokondriális fehérjét írtak le. Schwanstecher munkacsoportja (219) szintén kimutatott néhány alacsonyabb molekulásúlyú (140-175 kDa) és egy 38 kDa méretű magas szulfonilurea-kötés aktivitású fehérjét. Úgy tűnik tehát, hogy van néhány  $K_{ATP}$  alegységként lehetségesen funkcionáló fehérje a mitokondrium membránokban, habár a SUR alegység esetében a kis molekulásúly és az N-terminális transzport szekvencia hiánya mindenképpen arra utal, hogy itt egy másik fehérje variánsról lehet szó.

## 5.2. Mitokondriális nitrogén monoxid (NO) termelés mechanizmusa

### 5.2.1. A mitokondriális NO termelés szerepe az organellum működésében

A nitrogén monoxid egyrészt a mitokondriumokon hat, másrészt ott is termelődik, illetve bediffundál a sejtbe, ezért jelentős szerepet játszik az organellek működésében (28. ábra). A mitokondriumban zajlik az urea ciklus nagy része, és több arginin metabolizáló enzim van jelen a mátrixban (102). Az L-arginin az arginin transzporter fehérjén keresztül lép be. A mátrixban az arginin ornitinné és citrullinná alakul, amely aztán elhagyja a mitokondriumot, ahol visszaalakul argininné. A mtNOS egy shortcut lehet ebben a ciklusban, mivel az argininből NO-t és citrullint állít elő. A koncentrációk és affinitások azonban az urea ciklust preferálják: még a NOS aktivitásra optimalizált *in vitro* körülmények között és argináz inhibitorok jelenlétében a máj mitokondrium preparátumok argináz aktivitása 1-2 nagyságrenddel nagyobb, mint a NOS aktivitás. Mindezek felett a mitokondriumok arginine-decarboxylaset tartalmaznak, amely az arginint agmatinná alakítja, amely egy ismert NOS gátlószer (101).

Függetlenül attól, hogy az NO a mitokondriumból vagy kívülről jön, a légzési lánc egy kulcsfontosságú regulátora. Nanomoláris NO gátolja a légzési láncot, mivel kompetál az O<sub>2</sub>-vel. A citokróm-c oxidáz átalakítja az NO-t NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-vé, amely NO<sub>3</sub><sup>-</sup> alakítja tovább a ketoglutarate-dehydrogenase complex (101, 109, 110, 118). Szintén kimutatták, hogy a mitokondriumokban van nitrát reduktáz aktivitás, amely az NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-t NO-vá alakítja, bár ezt csak szigorúan hipoxiás körülmények között lehetett mérni (136, 137).

Az NO-nak többféle sorsa lehet a mitokondriumban. Az elektron transzport lánc folyamatosan termel szuperoxidot, amely gyorsan átalakul peroxinitritté (ONOO<sup>-</sup>). A ONOO<sup>-</sup> irreverzibilisen gátolja a III-as komplexet, és leírtak egy ONOO<sup>-</sup> által aktivált PARP kaszkádot is, amelyet részletesen alább tárgyalunk az 5.2.5. fejezetben (145).

### 5.2.2. Mitokondriális NO termelés hipoxiában

NOS aktivitás mérése mitokondriális preparátumokból három hajban és három különböző szövetben hasonló eredményeket hozott. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy egy alacsony NOS aktivitás minden mitokondriumban kimutatható, amely egyezik azzal a megfigyeléssel, hogy alacsonyabb szintű

élőlényekben is megtalálható, amely arra utal, hogy a mitokondriális eredetű NO egy evolúciósan megőrzött regulációs mechanizmus [22].

Saját kísérleteinkben a mtNOS keresztreakciót mutatott az eNOS-sal, de nem az iNOS-sal vagy nNOS-sal, az enzim teljes mértékben dependens volt a calmodulinon, és a molekulásúlya  $\approx 140$  kDa. Ezen adatok alapján azt találtuk, hogy legalábbis egér máj mitokondriumokban van egy eNOS-szerű NOS izoforma. Patkány máj mitokondriumokban Bates és munkatársai is leírtak egy eNOS-jellegű immunoreaktivitást, míg Tatoyan és Giulivi ezzel ellentétes adatot közölt [11, 15]. Ők egy makrofágban található iNOS-jellegű immunoreaktivitást találtak, bár ennek az enzimnek a konstitutív jelenléte és teljes dependenciája a Calmodulinon valószínűtlenné teszi, hogy azonos lenne az indukálható NOS-sal [9, 14, 23, 24]. Figyelembe kell venni, hogy a legtöbb tanulmányt patkány máj mitokondriumokon végezték, noha jelentős szöveti és faj variabilitás tételezhető fel. Az is elképzelhető, hogy a mitokondriumba targetált NOS variáns jelentős poszttranszlációs módosuláson megy át, amely befolyásolhatja az antigenitását.

### 5.2.3. Érvek a NOS jelenléte mellett a mitokondriumokban

Mindössze 3 emlős gént ismerünk, amely NOS enzimet kódol: Az endoteliális 140 kDa-os fehérjét (eNOS), amely endotél sejtekben van jelen és az értónus szabályozásában szerepet játszó NO fő forrása. A neuronális NOS génje 4 fehérjét kódol: a 160 kDa nNOS $\alpha$  az agyi NOS aktivitás 95% -ért felelős (Huang and Lo, 1998, Prog Brain Res, 118, 13-25). A 155 kDa nNOS $\beta$  szintén konstitutív, és a fennmaradó 5% aktivitásért felel (213). Az nNOS $\gamma$  125 kDa méretű, funkciója ismeretlen. Szintén ismert egy kardiális nNOS variáns (nNOSm), amely egy további peptid hurkot tartalmaz és pontos funkciója nem tisztázott. Az indukálható NOS egy 130 kDa fehérjét kódol, amely elsősorban makrofágokban van jelen és calmodulintól függetlenül aktív. Mivel a mitokondriális genomban nincs NOS gén, ezért a fenti gének terméke jöhet szóba mint mtNOS, amennyiben a mitokondriumban lokalizálódik.

Az első kísérlet, amelyet Bates és munkatársai végeztek eNOS immunoreaktivitást mutatott ki a belső mitokondriális membránban (103, 104), amelyet mi és mások is meg tudtak ismételni (105, 129) (105). Az enzim



funkcionális jelenlétét erősíti a megfigyelés, miszerint NADPH diaphorase aktivitás van jelen a mitokondriumban (19). Később indukálható NOS immunreaktivitást is kimutattak mitokondriumban, amelyet ki tudtak egészíteni aktivitás mérésekkel is (97, 98).

Több kutató is megkísérelte azonosítani a mtNOS-t a három ismert NOS gén termékével. Giulivi és munkatársai anti-iNOS és anti-nNOS antitestekkel azonosítottak egy mtNOS-t. Noha ez a 130 kDa fehérje kisebb, mint ami az nNOS-tól várható lenne, a protein mass fingerprinting az nNOS  $\alpha$  izoformájával azonosította (106, 107) (107). Saját kísérletekben mi is megtaláltuk vélhetően ugyanezt a fehérjét ugyanezekkel az antitestekkel, amely viszont jelen volt nNOS $\alpha$  knockout egerekben. Kanai szintén knockoutokkal igyekezett az mtNOS-t azonosítani (220). Ők izolált szív mitokondriumokban mértek NOS aktivitást elektrokémiai elektródokkal, amely nNOS $\alpha$  knockout egerekben nem volt jelen.

Mitokondriális NO-t gomba és növény fajokban is kimutattak. Az élesztő mtNOS aktivitása nő hipoxiában (221). A növény változatot először Arabidopsis Thaliana-ban mutatták ki, amely szintén oxidatív stresszben játszik szerepet (222). Ezek alapján felállítható egy érdekes hipotézis miszerint a növény mtNOS, amelyet atNOS-nak is neveznek jelen lehet emlős mitokondriumokban is (223). Az eredeti cikk megjelenése után azonban egy korrigendumot közöltek a szerzők, amely a lényegi eredményeket cáfolja, ezért erről a hipotézisről egyelőre nem lehet többet állítani.

A mtNOS definíciója azt sugallja, hogy az enzim legyen jelen a mátrixban. Ezzel szemben a mitokondrium külső membránjához asszociált NOS is funkcionálisan azonos lehet a mtNOS-sal. Ezt támasztja alá, hogy a korai cikkekben leírt NADPH diaphorase aktivitás a mitokondriumokhoz asszociált (19). Henrich és munkacsoportja azt írta le, hogy a NOS a juxtamitochondriális endoplazmás retikulumban lokalizálódik (131). Gao és munkatársai ezt kimutatták endotél sejtekben is, sőt, azonosítottak egy pentabasic aminosav szekvenciát az eNOS autoinhibitory doménjében, amely dokkolja az enzimet a membránokhoz (132). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a mtNOS valójában egy citoplazmikus enzim, amely a mitokondrium membránjához kötődik. Jelenleg nincsen elég kísérletes bizonyíték ezen

hipotézis igazolására, de a caveoláris elhelyezkedésű eNOS mintájára ez könnyen elképzelhető.

#### 5.2.4. Érvék a NOS jelenléte ellen a mitokondriumokban

Több mint 15 évvel az első megfigyelések után, amelyek arra utaltak, hogy a mitokondriumok NOS-t tartalmaznak, a tudományos közvéleményben még mindig nincsen egyetértés abban, hogy az enzim valóban létezik-e. Ennek egyik oka, hogy a kulcsfontosságú kísérleteket kevesen tudták reprodukálni, illetve mert a mért NOS aktivitás olyan alacsony, hogy az élettani hatása megkérdőjelezhető. Az elmúlt években több tudományos munka is megjelent, amely cáfolja a mtNOS létezését.

A ma már elérhető *in silico* proteomikai eszközök képesek nagy biztonsággal megjósolni, hogy egy adott fehérje szekvencia milyen organelumba targetált. Ezek használatával nem találtunk az ismert NOS enzimeken olyan N-terminális szekvenciát, amely a mitokondriumba irányította volna azokat (100). Az is ismeretlen továbbá, hogy minden szükséges kofaktor jelen van-e megfelelő mennyiségben a mitokondriális mátrixban, amely a NOS működéséhez szükséges (21). Ahogy korábban is bemutattuk, a mitokondriális mátrix több arginin felhasználó enzimet tartalmaz, amelyek versenyeznek a hipotetikus mtNOS-sal a szubsztrátért, ezért az egyértelmű, hogy a mátrix nem az a környezet, amelyben egy NOS enzim optimálisan tud működni.

Egy korai cikkben azt közöltük, hogy kicsi, de szignifikáns NOS aktivitás található máj mitokondriumokban, amelyet eNOS immunoreaktivitás kísérletekkel is megtámogattunk (129). Sajnos a további kísérletek során nem tudtuk ezt a konklúziót megerősíteni, sőt, olyan eredményeket találtunk, amelyek megkérdőjelezik a korai mérések eredményét. Noha a NOS aktivitás hipoxia után emelkedett volt, ezt nem tudtuk támogatólag igazolni sem a NOS fehérje mennyiségének növekedésével, sem a foszforiláció változásával, ezért maga a jelenség is kérdésessé vált. A későbbiekben több kutatócsoport is igazolta, hogy oxigén szegény környezetben emelkedett a mitokondriális NOS termelés, de ennek mechanizmusa máig ismeretlen (126). Később azt is kimutattuk, hogy a mért arginin konverzió a mitokondriumokban valójában nem a NOS aktivitás

függvénye (100). Egy másik kutatócsoport hasonló eredményeket közölt, de más módszertan felhasználásával, ezért valószínűsíthető, hogy a mitokondriumok nem termelnek szignifikáns mennyiségű NO-t (20). További kísérleteinkkel szintén a mitokondriális NOS enzim hiányát tudtuk igazolni szívben és agyban is, amely megerősíti ezeket a megfigyeléseket (100, 116). Talán a legfontosabb mérésünk az volt, amikor humán szív mitokondriumokban sem találtunk kimutatható NOS aktivitást, ezzel megkérdőjelezve az enzim után való kutatások fontosságát (224).

Mindenképpen figyelembe kell venni azt a tényt, hogy bármilyen mitokondriális preparátum tartalmaz 1-4% citoplazmikus kontaminációt, és hogy minden szövet tartalmaz több-kevesebb NOS-t (99, 202). Ennek fényében minden mitokondriális NOS mérést össze kell vetni ugyanazon szövet homogenizátumában mért értékkel, és ha a mitokondriális szint mindössze néhány százaléka a teljes szövetének, akkor azt kontaminációnak kell tekinteni. Ugyanezt az elvet célszerű követni Western blotoknál is. Sajnos azonban egyetlen olyan cikk sem jelent meg, amely a mtNOS jelenlétét ezen követelmény figyelembe vételével írta volna le.

Kiterjedt pozitív és negatív kontrollok használatával ki tudtuk zárni, hogy bármelyik ismert NOS izoforma jelen lenne a mitokondriumokban. Az természetesen vitatható, hogy tökéletlen módszerekkel végzett vizsgálatokkal nem lehet teljesen kizárni egy hipotézist, ezért a méréseink eredményét elvetik. Ezzel szemben én azt gondolom, hogy ha nem is lehet teljesen kizárni a mtNOS jelenlétét, az összes negatív eredmény tömege arra utal, hogy mennyisége, jelentősége igen csekély, ezért mégha jelen van is, annak élettani fontossága elhanyagolható (20, 100, 116, 225, 226). A szakirodalom kritikai elemzése után Brookes is ugyanerre a következtetésre jutott (21).

#### 5.2.5. A mitokondriális NO alternatív forrásai

Az emlősökben keresett mtNOS talán valóban nem létezik, de alacsonyabbrendű fajokban van meggyőző bizonyíték a NOS jelenlétére. Egy bakteriális NOS variánst leírtak *Bacillus Subtilis*-ben (130). Ez az enzim mutat homológiát az emlős NOS oxigenáz domainjével, de sokkal kisebb fehérje.

Rekombináns NOS reduktáz domén és HEM jelenlétében képes arginint citrullinná konvertálni és NO-t termelni. Arra egyelőre nincsen bizonyíték, hogy ez az enzim jelen lenne a többsejtűek mitokondrimaiban is.

Kozlov és munkatársai írták le először, hogy a mitokondriális légzési lánc önmagában képes lehet NO termelésre (136, 137). A légzési lánc egyes elemeinek szelektív gátlása révén azt találták, hogy az ubiquinon ciklus képes nitrát redukálása révén NO-t termelni anoxiás körülmények között. Később hasonló reakciót írtak le zöldalgákban is, amely arra utal, hogy ez a mechanizmus evolúciósan megőrződött (227). Mi egy fluoreszcens módszerrel detektáltunk erős mitokondriális nitrogén tartalmú oxidáns szinteket, amelyet szintén az ubiquinon ciklus gátlásával lehetett blokkolni (226). Ebben a kísérletben azt is kimutattuk, hogy a szignál nem függ sem az arginintól, sem  $\text{Ca}^{++}$ -tól, hanem a mitokondriális légzési lánc első felének működésétől. Technikai okok miatt ezzel a módszerrel nem lehetett vizsgálni, hogy vajon mi lehet a reakció szubsztrátja. Emlékeznünk kell arra is, hogy a DAF festékek elsősorban nem NO-val, hanem nitrogén tartalmú egyéb oxidánsokkal, többek között  $\text{N}_2\text{O}_3$ -mal reagálnak (228). Ez az apoláris molekula valószínűleg az, amelyet a mitokondriális kísérletekben detektálunk. Mivel a DAF jel általában a mitokondriumokban dúsul, ezért az véleményezhető, hogy ugyan a mitokondrium igen kevés vagy semennyi NO-t sem termel, de mégis a nitrogén tartalmú oxidánsok fő forrása a sejtben (100, 116, 117, 226, 229, 230). Boveris és munkatársai által végzett mérések is támogatják ezt a hipotézist, miszerint a mitokondriális NO-jellegű szignál feszültségfüggő (231).

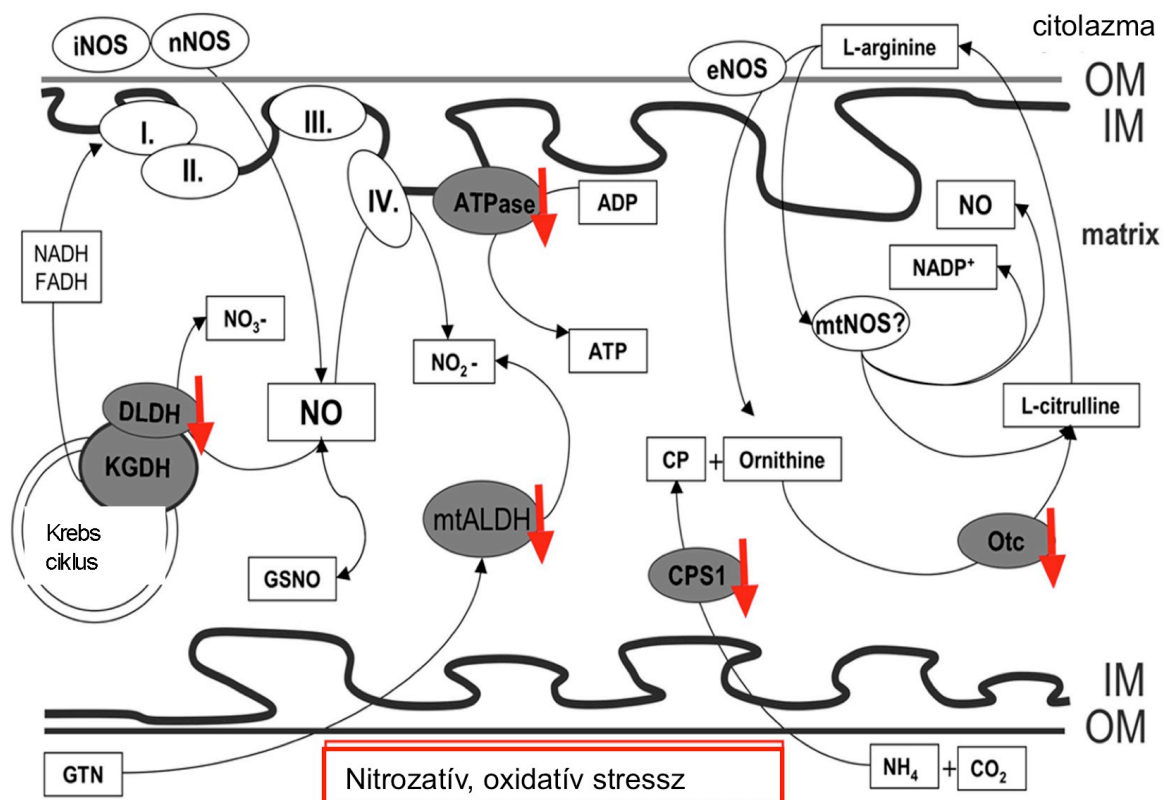
A mitokondriális fehérjék és a tripeptid glutation sok tiol reziduumot tartalmaznak, amely képes az NO-t reverzibilisen megkötni. Ez a tiol tömeg képes megkötni jelentős mennyiségű NO-t, majd ezt leadni a mátrixba (232). Kísérleti körülmények között az NO felszabadulását a nitrozótiol kötésekből elő lehet segíteni fény vagy hő alkalmazásával, bár ez nem sokat mond az élettani viszonyokról.

#### 5.2.6. Mitokondriális fehérje nitroziláció és PARP aktivitás

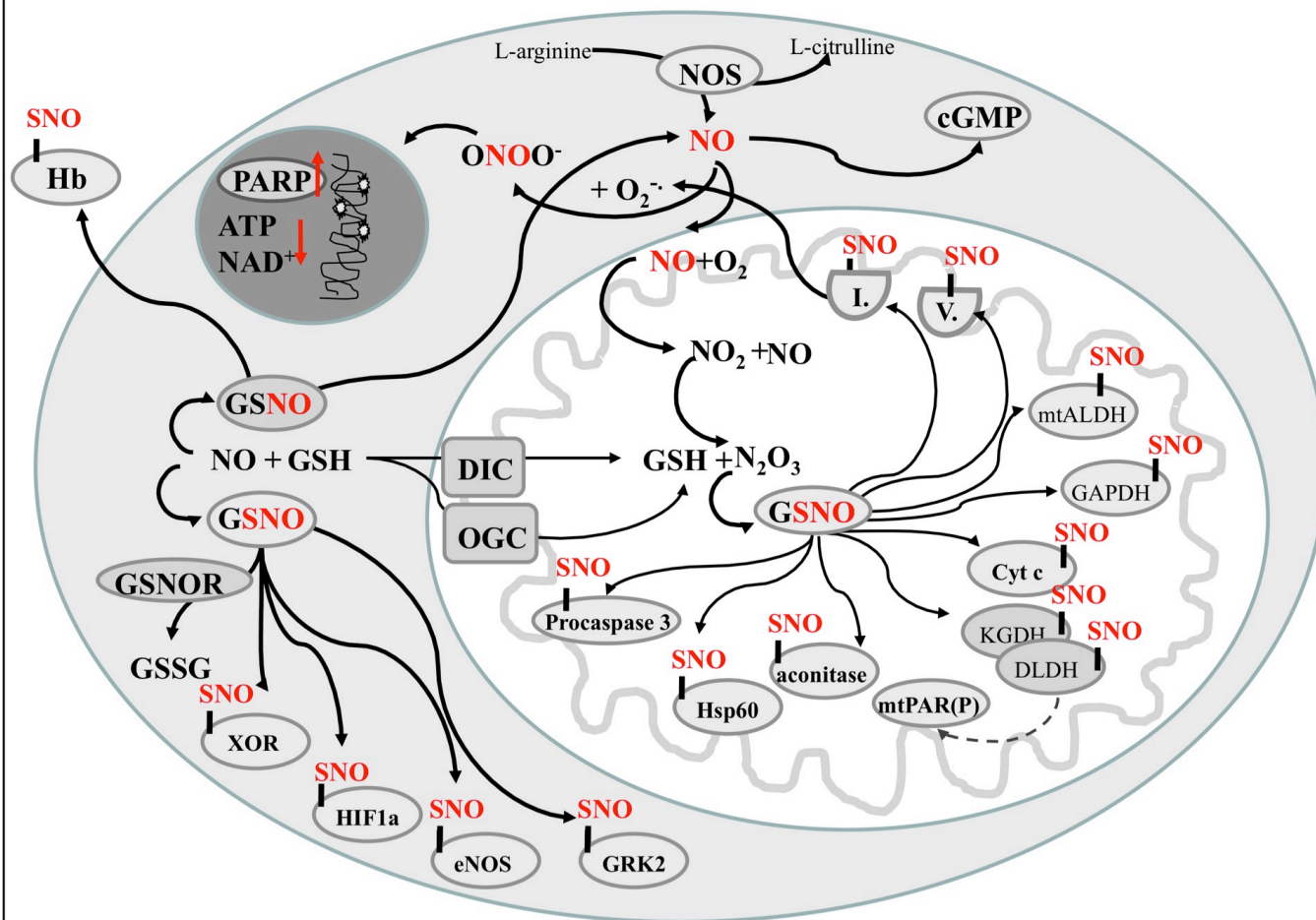
A PAR túlaktiváció oxidatív-nitrozatív stressz esetén a sejthalál egy kulcsfontosságú mechanizmusa (233). Több kísérleti eredmény is arra utal, hogy jelentős kapcsolódás van a mitokondriális és sejtmagi funkciók között a folyamatban, és a PAR formáció ennek egyik eleme. A láncolat egyes pontjaira van kísérletes bizonyíték, a teljes mechanizmus azonban egyelőre nem tisztázott. Du és munkatársai kimutattak egy PARP enzimet a mitokondriumokban (145). Noha a PARP szerepet játszhat a mitokondriális DNS javításában, a fehérjét is PAR-álhatja közben (234). Egy másik tanulmány leírta, hogy PAR polimerek stimulálják az apoptózis indukáló faktor (AIF) transzlokációt a mitokondriumból a sejtmagba (235). Saját kísérleteinkben azt találtuk, hogy oxidatív vagy nitrozatív stressz több mitokondriális fehérjét PAR-ál, köztük a KGDH komplex elemeit (28. ábra) (236).

Több mitokondriális enzimről kimutatták, hogy részt vesznek az ADP-ribozilációban (237-239). Saját eredményeink szerint az egyik leginkább érintett enzim a DLDH, amely többirányú enzimaktivitással rendelkezik, ezek között a KGDH komplex egyik eleme (240-242). A KGDH egyrészt az oxidatív stressz egyik kiváltója másrészt károsodik is a működése oxidatív stressz hatására (217, 218). A KGDH egy komplex enzimrendszer, amelynek az aktivátása függ az ATP, ADP és kalcium szintektől illetve a NADH/NAD<sup>+</sup> aránytól. Egy korábbi cikk kimutatta, hogy a NAD<sup>+</sup> mennyiség csökkenése oxidatív stressz után gátolja a glikolízist a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gátlása miatt, mivel így csökken a Krebs ciklusba jutó glukóz karbon mennyisége. Hasonlóképpen, a Krebs ciklus szubsztrátjainak adása gátolja a sejthalált (243). Ezek a megfigyelések együttesen arra utalnak, hogy a KGDH jelentős szerepet játszik az oxidatív stressz által okozott mitokondriális diszfunkcióban és DNS károsodásban. Jelen kísérleteink ehhez szolgáltatnak további bizonyítékot egy korábban ismeretlen molekuláris mechanizmus leírásával, amely kapcsolatot talált a PARP aktivitás és a KGDH között. A DLDH-nak dehydrogenase, diaphorase és proteáz aktivitása is ismert (240-242), de az NO-t is semlegesíti a NADH mint elektron donor felhasználásával (210). Mi azt mutattuk ki elsőként, hogy a DLDH nitrálódik GSNO hatására, majd ebből arra következtettünk hogy a DLDH szerepet játszhat a mitokondriális poliADP-ribozilációban is. Több párhuzamos módszerrel is kimutattuk, hogy a DLDH a KGDH komplex részeként

képes mérhető PARP aktivitást mutatni. A jelenség együttesen tehát azt igazolja, hogy a mitokondriumokban található nitrált fehérjék és peptidek, közülük is minden bizonnyal főként a GSNO, aktiválni képes egy önálló PARP kaszkádot a mitokondriumokban, amely a sejtmagi PARP-tól függetlenül működik. Mivel a PAR polimerekről ismert, hogy sejthalált váltanak ki a mitokondriális sejtkárosító funkciók aktiválásával, ezért kísérleteink eredményével együtt egy teljes NO-függő mitokondriális sejthalál mechanizmust tudtunk rekonstruálni (29. ábra).



**28. ábra.** Két sejtpopuláció kölcsönhatása 24 órával az iszkémia és sejt-hozzáadás után. A károsodott sejteket piros, a megmentő sejteket zöld festékekkel jelöltük. Az A panelen reprezentatív konfokális mikroszkópos kép látható, amelyen jól elkülöníthetők a kétféle festékekkel jelzett sejtek, de van egy harmadik, kettős festésű (sárga) sejtpopuláció is. A B panelen egy ilyen kettősen jelölt sejt látható, amelynek magja is kettőzött (kék), ezért valószínűleg fúzió eredménye. A C panelen áramlási citometriás képen ábrázoltuk a sejttenyészetet, a zöld, piros és sárga populációk jól elkülönülnek, igazolva azt, hogy a festék átjutása nem passzív kémiai átoldódás, hanem valamilyen irányított folyamat. A D panelen ábrázolt scatterplot mutatja, hogy a sárga színű sejtek a magasabb fényszóródást mutató, azaz nagyobb méretű sejtpopulációban helyezkednek el, de az elkülönülés itt inkább csak jelzés szerű.



**29. ábra.** A mitokondriális és sejtszintű nitoziláció áttekintő ábrája.



#### 5.2.6. Nitroztatív stressz és a cukorbetegség szövődményeinek kialakulása.

A hiperglikémia által kiváltott káros hatások egy része a cukorszint normalizálódása után is fennmaradnak, ezt hívjuk hiperglikémiás memóriának. Kimutattuk, hogy a mitokondriális oxidánsok termelésének gátlása teljesen el tudja törölni ezt a memória effektust, viszont a sejtplazmai szabadgyök termelés gátlása csak részlegesen éri el ezt a hatást. Ez nem meglepő annak fényében, hogy a mitokondriális gyökök termelésének fokozása általában csak az első lépés a sejtkárosító reakciókban, amelyet mitokondriumok által kiváltott sejtplazmai és sejtmagi kaszkádok amplifikálnak (244-246).

A cukorbetegség több ismert szövődménye visszavezethető a mikrocirkuláció károsodására (247). A fő kórélettani tünete a mikrovaszkuláris károsodásnak a vazodilatációs kapacitás csökkenése, amely csökkent perfúzióhoz vezet még a klinikai tünetek megjelenése előtt. Mivel a vezető endoteliális értágító, az NO relatív hiánya okozza a mikrocirkulációs zavart, ezért annak pótlása terápiás lehetőségként is szóba jöhet. Saját kísérleteink azt mutatták, hogy súlyos diabéteszben is jelentős értágulatot tudtunk elérni helyileg alkalmazott NO donor GSNO adásával, amelyet később egészséges felnőtt embereken is megismételtünk (171). Hasonló eredményeket közölt egy másik kutatócsoport is, akik még az NO felszabadulás és az értágulat közötti regressziót is kimutattak (248-250).

A nitrotirozin kialakulása, mennyisége a nitroztatív stressz bevált markere (251). A nitrotirozin egy reverzibilis kötés, amely az adott fehérje funkcióját is módosítani képes, ezért a foszforilációhoz hasonlóan szabályozó mechanizmusként is felfogható. Mivel a mitokondriális NO termelésben a nitrozótiol kötések bomlása az egyik fő folyamat, ezért feltételezhető, hogy a GSNO alkalmazása befolyásolhatja a mitokondriális fehérjéket. A saját kísérleteinkben ezért értágító dózishoz elegendő GSNO alkalmazása után vizsgáltuk a szövetek nitrotirozin tartalmát, de nem láttunk különbséget sem a nitrozótiol mennyiség, sem a mintázat tekintetében.

A terhesség során kialakuló cukorbetegségben szintén a nitrozótiolt használtuk, mint a nitroztatív stressz markerét. Azt találtuk, hogy a nitrotirozin szint a keringő leukocitákban folyamatosan emelkedik a terhesség

előrehaladtával, amelynek többféle hatása is lehet. A peroxinitrit és protein nitráció kiválthat vazodilatációt, izomrelaxációt, illetve csökkent T-sejt proliferációt és vérlemezke aktivációt (252-255). Magasabb nitroztatív stressz szintek azonban nemcsak élettani jelenségeket produkálhatnak, hanem patológiás reakciókat is kiválthatnak, jellemzően PARP aktivációt és sejthalált (256). Egy közleményben Tawfik és munkatársai azt találták, hogy többször szült patkányokban csökkent az endotél függő relaxáció, amelyet összefüggésbe hoztak a nitroztatív stresszel, mivel a hatást a peroxinitrit semlegesítő FeTPPS gátolta (257). Saját kísérleteinkben ugyanezzel a szerrel a mitokondriális nitrogéntartalmú oxidánsok termelését tudtuk csökkenteni, arra azonban nincsen közvetlen adat, hogy a terhességi cukorbetegségben talált emelkedett nitroztatív stressz a mitokondriumból ered-e.

#### 5.2.7. A nitrozóglutation, mint lehetséges gyógyszerformuláció

Saját kísérleteinkben azt találtuk, hogy a GSNO erősen savas környezetben szinte teljes konverzió mellett szintetizálható, amelyet követően enyhén bázikus környezetben a leginkább lassult a bomlás. A bomlási folyamat tovább lassítható polimerek hozzáadásával, amelyek közül kiemelkedik a PEG/PVA elegy szintén enyhén bázikus környezetben. Ez a stabilizált GSNO formuláció a biológiai aktivitását nem veszítette el, mivel 200% véráramlás növekedést okozott a bőr mikrocirkulációjában.

Korábban is ismert volt, hogy a nitrozótiolok savas környezetben szintetizálhatóak, ezért igen meglepő volt, hogy a molekula stabilitása viszont magasabb pH-n a legnagyobb. Heikal és munkatársai alacsony GSNO koncentrációk mellett valóban azt találták, hogy a stabilitás savas környezetben nagyobb (258). Ahogy de Oliveira és munkatársai kimutatták, a nitrozótiolok stabilitása nagyban függ a kiindulási koncentrációktól, ezért fontos hogy a kísérleteket a véglegesen használni kívánt tartományban végezzük, ahogy mi is tettük (249). A hipotézisünk szerint a bázikus pH stabilizáló hatása a molekula protonáltsági állapotában keresendő. Vizes oldatokban a GSNO-nak 4 protonáltsági állapota lehetséges, amelyet a pH titrálása mellett vizsgáltunk. Kilenc körüli pH mellett a GSNO megoszlott a GSNO<sup>0</sup> és GSNO<sup>-</sup> állapotok között.

Ilyen viszonyok között az -SNO kötés stabilitását komplexkötések kialakulása vagy intermolekuláris kötések, pl. hidrogénhidak létrejötte okozhatja. Mivel a mért UV spektrumban nem jelentek meg új csúcsok pH 9 körül a tárolás során, ezért a logikus válasz az lehet, hogy a GSNO bomlik  $\text{GS}^-$  irányban, majd végül kialakulnak a kénhidak és GSSG lesz a végtermék, amelynek jellemző spektruma megfigyelhető a bomlási folyamat végén. Ezek a megfigyelések összecsengenek Manoj közlésével (259). Összefoglalva a kísérleteinket azt mondhatjuk, hogy a gyengén bázikus pH a szulfidkötés elektron struktúrájának átrendezése révén stabilizál, amelyet átmeneti komplexképződés is kísér. A gélképző anyagok, mint jól ismert gyógyszerészeti segédanyagok ezt a hatást tovább fokozzák, ezzel közelebb kerültünk egy klinikailag is elfogadható stabilitással rendelkező topikális nitrozótiol készítmény kifejlesztéséhez anélkül, hogy az endogén hatóanyag molekulán változtattunk volna, azaz megtartottuk az előnyös metabolikus tulajdonságait. A technológiát szabadalmaztattuk és értékesítettük egy gyógyszerfejlesztő cég részére, ahol további technológiai fejlesztés zajlik egy végleges formuláció létrehozásának irányában, amellyel a klinikai kipróbálások megkezdhetőek.

### 5.3. Sejtterápia szubcelluláris mechanizmusai

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az egészséges mezenhimális őssejtek hozzáadása megmenti a posztiszkémiás károsodott sejteket a 24 órán belül bekövetkező sejthaláltól, és ez a mechanizmus elsősorban sejt-sejt interakción alapul. Ahogy korábbi *in vivo* és *in vitro* kísérleteink is kimutatták teljes sejtfúzió megfigyelhető őssejtek beadása után a host és a graft között, de ezen jelenség igen ritka és előfordulása nincsen arányban a graft pozitív hatásaival. Ahogy az *in vivo* állatkísérletekben is láttuk, erőteljes oxidatív-nitrozatív stressz mutatható ki a lézió területén, amelynek gátlása önmagában képes javítani a beültetett sejtek túlélését. Az *in vitro* kísérletekben ezért elsősorban az oxidatív stressz és a graft kölcsönhatására fókuszáltunk.

#### 5.3.1. Sejtközzötti kapcsolatok szerepe

A leginkább valószínű magyarázat arra, hogy az MSC kokultúra megmenti a sérült H9c2 sejteket a későbbi sejthaláltól, hogy a megadott sejtek valamilyen módon stabilizálják a H9c2 sejtek állapotát, ezért azok nem lépnek be a sejthalál kaszkádokba. Az etídiom homodimerről ismert, hogy nem csak a halott, hanem a súlyosan sérült sejteket is képes megfesteni. Mivel a saját kísérletekben OGD után sok sejtet festett meg az Ethidium homodimer, és ezen sejtek egy részét később sikeresen megmentettük a végleges sejthaláltól, ezért valószínűleg reverzibilisen károsodottak voltak, amelyek viszont beavatkozás nélkül elpusztultak volna (260). Egy másik lehetséges magyarázat a nagyszámú élő sejt jelenlétére az lehetne, hogy a kevés túlélő sejt erőteljes expansziót mutat. Mivel 24 óra alatt közel tízszeres a különbség az élő sejtek számában a két csoport között, ezért önmagában a proliferáció felgyorsulása ezt nem tudja megmagyarázni.

A sejt-sejt közötti kapcsolatok szerepe az a hozzáadott sejtek általi megmentő folyamatban az egyik legérdekesebb megfigyelés a jelen dolgozatban. Amennyiben a sejteket egy fizikai barrier választotta el egymástól, de a tenyésztő oldat szabadon diffundálhatott, a megmentő hatás nem tudott érvényesülni. Megfigyeltük azt is, hogy a sejt-sejt kapcsolatok leginkább vékony membránhidakon keresztül valósulnak meg, amelyet a sejtek látszólag irányítottan csatolnak egymáshoz (261). Nanotubulusok kialakulását korábban is kimutatták endoteliális sejtek, kardiomiociták, immunsejtek között (261-264). Ezen nanocsövek elemzése kimutatta, hogy aktint tartalmaznak, és néhány esetben mikroszóma vagy mitokondrium is megtalálható bennük (200). Magunk is azt találtuk, hogy mitokondriumok megfigyelhetők ezekben a tubulusokban, amelyek potenciális szerepét a folyamatban az 5.3.4. fejezetben diszkutáljuk.

### 5.3.2. Parakrin faktorok?

Egy könnyen elképzelhető mechanizmus, amelynek révén a beültetett sejtek elősegítik a regenerációt a parakrin faktorok termelése (265-268). Mivel az általunk használt kísérleti rendszerben ez a hatás elenyésző volt, ezért azt állíthatjuk hogy legalábbis az általunk vizsgált szűk idő és térbeli tartományokban a sejtkapcsolatok szerepe a meghatározó a sejtterápia

hatásmechanizmusában. Mivel a kísérleteink időtávja behatárolt volt, és a 2-dimenziós sejtkultúra is csak mérsékelten modellezi az élő szövetet, ezért a sejtkapcsolatok és a parakrin hatások egymáshoz képest mérhető hatékonyságáról ezek alapján nem lehet véleményt mondani. Feltételezhetjük azonban, hogy amennyiben a sejtek hosszabb ideig vannak együtt és a graft differenciációja is megindul, akkor a parakrin hatások előtérbe kerülnek (269, 270).

### 5.3.3. Sejtfúzió

A sejtfúzió egy másik jól ismert jelenség, amelyet több *in vitro* és néhány *in vivo* kísérletben is kimutattak őssejtek és graft sejtek között (192, 199, 271). Több tanulmány is kimutatott sejtfúziót, amely a károsodott szövet regenerációjához, illetve a beültetett sejtek transzdifferentiációjához vezetett. *In vivo* állatkísérletekben szövettan, illetve *in vitro* videomikroszkópia segítségével kimutattunk mi is sejtfúziót, de ezek száma az összes átültetett sejthez viszonyítva igen kicsi volt, ezért inkább erősíti a kételyeket a sejtfúzió mint hatásmechanizmussal szemben semmint erősítené azt (272).

Az *in vitro* kísérletekben azonban sokkal több kettős festődésű sejtet találtunk, mint amennyit a sejtfúzió magyarázni tudott volna. Ezen kettős festődés lehet a sejthidak, nanotubulusok eredménye is, hiszen leírták Vybrant sejtmembrán festékek transzferét a nanocsövek találkozási pontjainál (273). Driesen és munkatársai kimutatták, hogy kis molekulásúlyú jelölők, pl. Calcein képes átjutni a réskapcsolatokon, míg nagyobb molekulásúlyú jelölők inkább parciális sejtfúzió révén jutnak át egyik sejtől a másikba (274). Részletesen elemeztük azt a kérdéskört is, hogy a kettős festés valamilyen aspecifikus fizikokémiai folyamat eredménye lehet, például a közel lévő vagy érintkező sejtek között a festékek átoldódnak a másik membránba. Ezen technikai kísérletek kimutatták, hogy a Vibrant festékek (DiO, DiD, DiL) nem mutatnak keresztfestődést, viszont a Mitotrackerred és green festékek igen, legalábbis olyan mértékben, amely alkalmatlanná teszi ezeket a mitokondriális markereket a kettős festés vagy mitokondriális transzfer vizsgálatára. A részletes technikai

eredményeket egy kézikönyv fejezetben összegeztük, részletes ismertetésük meghaladja a jelen dolgozat terjedelmét (275).

#### 5.3.4. Mitokondriumok szerepe a sejtek megmentésében

A jelen dolgozatban is bemutatott kísérleti bizonyítékok arra utalnak, hogy a beültetett sejtekben jól működő, respiráló mitokondrium állományra van szükségük ahhoz, hogy a megmentő hatást el tudják érni. Noha korábbi kísérletek felvetették a lehetőségét, hogy a mitokondriumok transzlokálódnak egyik sejtől a másikba, ezt a jelenséget nekünk nem sikerült megfigyelni (200). Ez az eredmény rávilágít arra, hogy a klinikai kísérleti fejlesztések során mennyire fontos lehet az eredményesség szempontjából a beültetett sejtek állapotának részletes elemzése, monitorozása. Elképzelhető ugyanis, hogy ha mindössze egyszerű életképesség vizsgálatot végeznek a graft sejteken, az jó életképességet mutat, de a sejtek mégsem lesznek képesek hatékonyan gyógyítani. A súlyosan mitokondrium-ledált sejtek is, amelyeket a kísérletekben használtunk, magas életképességet mutattak, de nem voltak képesek a várt megmentő hatást elérni.

## 6. Új tudományos eredmények és következtetések (tézisek)

A dolgozatban ismertett tudományos eredmények téziseit az alábbi 5 pontban foglalom össze. A kutatási eredmények eléréséhez három új kísérleti vizsgáló módszert is ki kellett fejleszteni, amelyek önálló módszertani közleményekben és könyvfejezetekben jelentek meg. Az alapkutatási eredmények révén azonosítottunk egy új terápiás lehetőséget, amelynek kiaknázására egy gyógyszerformulációt szabadalmaztattunk, és amelyet jelenleg egy gyógyszergyár fejleszt tovább a klinikai alkalmazhatóság irányába.

### 6.1. A mitokondriális ATP-függő K-csatornák alegység összetétele

Az iszkémiás prekondíciókiváltásában alapvető szerepet játszó mitoK<sub>ATP</sub> csatornák feltételezhető alegységeinek azonosítása során megállapítottuk, hogy a pórus formáló Kir6.1 és Kir6.2 jelen van a mitokondriális membránokban. A klasszikus K<sub>ATP</sub> csatorna gátlószer szulfonilurea-kötőhely is kimutatható mind szív, mind agy mitokondriumokban, de egyik ismert szulfonilurea-receptor sem targetált a mitokondriális mátrixba. Ezek alapján feltételezhető, hogy egy új típusú K<sub>ATP</sub> csatorna az, amely a mátrix K-egyensúlyának fenntartásában részt vesz.

### 6.2. NOS-enzim független mitokondriális NO termelés mechanizmusa

A mitokondrium, mint a reaktív nitrogén tartalmú ágensek fő támadáspontja maga is képes lehet NO termelésére. Sokrétű kísérletes megközelítésből kimutattuk, hogy egyik ismert NO-szintáz enzim sincsen jelen a mitokondriumokban amely érdemi mennyiségben képes lenne NO-t termelni. Ezzel szemben igazoltuk, hogy a mitokondriális légzési lánc ubiquinon ciklusa képes reaktív nitrogén tartalmú ágenseket termelni.

### 6.3. Mitokondriális fehérje nitráció és PARP aktivitás

Oxidatív stressz esetén a mitokondriális fehérjék tiol csoportjai nitrálódnak, illetve poli-ADP-ribóz oldalláncok kapcsolódnak hozzájuk, ezzel befolyásolva az érintett fehérjék funkcióját. Kimutattuk, hogy az egyik ilyen fehérje a dihidrolipoamid-dehidrogenáz (DLDH), majd több párhuzamos módszerrel is igazoltuk, hogy a DLDH a KGDH komplex részeként képes mérhető PARP aktivitást mutatni. A mitokondriális eredetű nitrogén tartalmú oxidánsok aktiválni képesek egy önálló PARP kaszkádot a mitokondriumokban, amely a sejtmagi PARP-tól függetlenül működik. Mivel a PAR polimerekről ismert hogy sejthalált váltanak ki a mitokondriális sejtkárosító funkciók aktiválásával, ezért kísérleteinkkel egy teljes NO-függő mitokondriális sejthalál mechanizmust tudtunk rekonstruálni

#### 6.4. Nitroztatív stressz és a cukorbetegség szövődményei

A cukorbetegség több szervet érintő szövődményeinek kialakulásában is kulcsszerepet játszik a nitroztatív stressz és a relatív NO hiány, mivel az NO metabolizmusa az értágító és trombocita aggregáció csökkentő NO felől eltolódik a nitroztatív stresszt kiváltó peroxinitrit felé. Ezen mechanizmust kimutattuk ingadozó vércukorszint okozta endotél diszfunkcióban, terhességi cukorbetegségben, illetve igazoltuk, hogy cukorbeteg láb szindrómában az NO külsőleges bevitele képes jelentősen javítani a mikrocirkulációt. Ez utóbbi felismerés vezetett oda, hogy egy új gyógyszerformulációt dolgoztunk ki, amely NO donorként a (mellesleg a mitokondriumokban is jelen lévő) GSNO-t tartalmaz.

#### 6.5. Mitokondriumok szerepe az iszkémiát követő sejterápiában

Az iszkémiás károsodás után transzplantált őssejtek többféle úton képesek javítani a sérült szövet működését. A transzdiffúzió, sejtfúzió és a parakrin faktorok mellett elsőként leírtunk egy negyedik lehetséges mechanizmust, a sejt-sejt közötti kapcsolatok szerepét. A sejt-sejt kapcsolat leginkább vékony membránhidakon, nanotubulusokon keresztül valósul meg, amelyet a sejtek irányítottan csatolnak egymáshoz. A beültetett sejtekben jól



működő, respiráló mitokondrium állományra van szükség ahhoz, hogy a megmentő hatást el tudják érni, de közvetlen mitokondrium transzfer nem történik.

## 7. Hivatkozások

1. Bajgar, R., S. Seetharaman, A. J. Kowaltowski, K. D. Garlid, and P. Paucek. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* 2001;276:33369-33374.
2. Aguilar-Bryan, L., and J. Bryan. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* 1999;20:101-135.
3. Szewczyk, A. Intracellular targets for antidiabetic sulfonylureas and potassium channel openers. *Biochem Pharmacol* 1997;54:961-965.
4. McLaine, P. N., and K. N. Drummond. Intravenous diazoxide for severe hypertension in childhood. *J Pediatr* 1971;79:829-832.
5. Murata, M., M. Akao, B. O'Rourke, and E. Marban. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix  $\text{Ca}^{2+}$  overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 2001;89:891-898.
6. Dzeja, P. P., P. Bast, C. Ozcan, A. Valverde, E. L. Holmuhamedov, D. G. Van Wylen, and A. Terzic. Targeting nucleotide-requiring enzymes: implications for diazoxide-induced cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1048-56.
7. Cohen, M. V., and J. M. Downey. Is It Time to Translate Ischemic Preconditioning's Mechanism of Cardioprotection into Clinical Practice? *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011;16:273-280.
8. Downey, J. M., and M. V. Cohen. Do mitochondrial  $\text{K}(\text{ATP})$  channels serve as triggers rather than end-effectors of ischemic preconditioning's protection? *Basic Res Cardiol* 2000;95:272-274.
9. Downey, J. M., and M. V. Cohen. Mitochondrial  $\text{K}(\text{ATP})$  channel opening during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:651-653.
10. Nakano, A., M. V. Cohen, and J. M. Downey. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther* 2000;86:263-275.

11. Oldenburg, O., M. V. Cohen, and J. M. Downey. Mitochondrial K(ATP) channels in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:569-575.
12. Oldenburg, O., M. V. Cohen, D. M. Yellon, and J. M. Downey. Mitochondrial K(ATP) channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2002;55:429-437.
13. Pain, T., X. M. Yang, S. D. Critz, Y. Yue, A. Nakano, G. S. Liu, G. Heusch, M. V. Cohen, and J. M. Downey. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000;87:460-466.
14. Suzuki, M., R. A. Li, T. Miki, H. Uemura, N. Sakamoto, Y. Ohmoto-Sekine, M. Tamagawa, T. Ogura, S. Seino, E. Marban, and H. Nakaya. Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* 2001;88:570-577.
15. Suzuki, M., N. Sasaki, T. Miki, N. Sakamoto, Y. Ohmoto-Sekine, M. Tamagawa, S. Seino, E. Marban, and H. Nakaya. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* 2002;109:509-516.
16. Shake, J. G., E. A. Peck, E. Marban, V. L. Gott, M. V. Johnston, J. C. Troncoso, J. M. Redmond, and W. A. Baumgartner. Pharmacologically induced preconditioning with diazoxide: a novel approach to brain protection. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1849-1854.
17. Liu, D., C. Lu, R. Wan, W. W. Auyeung, and M. P. Mattson. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:431-443.
18. Gross, G. J., and J. N. Peart. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H921-30.
19. Loesch, A., A. Belai, and G. Burnstock. An ultrastructural study of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in the perivascular nerves and vascular endothelium of the rat basilar artery. *J Neurocytol* 1994;23:49-59.

20. Tay, Y. M., K. S. Lim, F. S. Sheu, A. Jenner, M. Whiteman, K. P. Wong, and B. Halliwell. Do mitochondria make nitric oxide? no? Free Radic Res 2004;38:591-599.
21. Brookes, P. S. Mitochondrial nitric oxide synthase. Mitochondrion 2004;3:187-204.
22. Lacza, Z., J. A. Snipes, B. Kis, C. Szabo, G. Grover, and D. W. Busija. Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in the brain. Brain Res 2003;994:27-36.
23. Lacza, Z., J. A. Snipes, A. W. Miller, C. Szabo, G. Grover, and D. W. Busija. Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K<sup>+</sup> channels. J Mol Cell Cardiol 2003;35:1339-1347.
24. Gordon, D. M., A. Dancis, and D. Pain. Mechanisms of mitochondrial protein import. Essays Biochem 2000;36:61-73.
25. Robin, M. A., S. K. Prabu, H. Raza, H. K. Anandatheerthavarada, and N. G. Avadhani. Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70. J Biol Chem 2003;278:18960-18970.
26. Stojanovski, D., A. J. Johnston, I. Streimann, N. J. Hoogenraad, and M. T. Ryan. Import of nuclear-encoded proteins into mitochondria. Exp Physiol 2003;88:57-64.
27. Szewczyk, A., G. Wojcik, N. A. Lobanov, and M. J. Nalecz. The mitochondrial sulfonylurea receptor: identification and characterization. Biochem Biophys Res Commun 1997;230:611-615.
28. Sharma, N., A. Crane, J. P. t. Clement, G. Gonzalez, A. P. Babenko, J. Bryan, and L. Aguilar-Bryan. The C terminus of SUR1 is required for trafficking of KATP channels. J Biol Chem 1999;274:20628-20632.
29. Melamed-Frank, M., A. Terzic, A. J. Carrasco, E. Nevo, A. Avivi, and A. P. Levy. Reciprocal regulation of expression of pore-forming KATP channel genes by hypoxia. Mol Cell Biochem 2001;225:145-150.
30. Rajapakse, N., K. Shimizu, B. Kis, J. Snipes, Z. Lacza, and D. Busija. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels prevents neuronal cell death after ischemia in neonatal rats. Neurosci Lett 2002;327:208-212.

31. Seharaseyon, J., A. Ohler, N. Sasaki, H. Fraser, T. Sato, D. C. Johns, B. O'Rourke, and E. Marban. Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1923-1930.
32. Shimizu, K., Z. Lacza, N. Rajapakse, T. Horiguchi, J. Snipes, and D. W. Busija. MitoK(ATP) opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1005-11.
33. Thomzig, A., M. Wenzel, C. Karschin, M. J. Eaton, S. N. Skatchkov, A. Karschin, and R. W. Veh. Kir6.1 is the principal pore-forming subunit of astrocyte but not neuronal plasma membrane K-ATP channels. *Mol Cell Neurosci* 2001;18:671-690.
34. Terzic, A., P. P. Dzeja, and E. L. Holmuhamedov. Mitochondrial K(ATP) channels: probing molecular identity and pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1911-1915.
35. Debska, G., R. May, A. Kicinska, A. Szewczyk, C. E. Elger, and W. S. Kunz. Potassium channel openers depolarize hippocampal mitochondria. *Brain Res* 2001;892:42-50.
36. Garcia de Arriba, S., H. Franke, M. Pissarek, K. Nieber, and P. Illes. Neuroprotection by ATP-dependent potassium channels in rat neocortical brain slices during hypoxia. *Neurosci Lett* 1999;273:13-16.
37. Garlid, K. D. Cation transport in mitochondria--the potassium cycle. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:123-126.
38. Inoue, I., H. Nagase, K. Kishi, and T. Higuti. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991;352:244-247.
39. Paucek, P., V. Yarov-Yarovoy, X. Sun, and K. D. Garlid. Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. *J Biol Chem* 1996;271:32084-32088.
40. Szewczyk, A., A. Czyz, G. Wojcik, L. Wojtczak, and M. J. Nalecz. ATP-regulated K<sup>+</sup> channel in mitochondria: pharmacology and function. *J Bioenerg Biomembr* 1996;28:147-152.
41. Sato, T., B. O'Rourke, and E. Marban. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channels by protein kinase C. *Circ Res* 1998;83:110-114.

42. Bari, F., T. M. Louis, W. Meng, and D. W. Busija. Global ischemia impairs ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel function in cerebral arterioles in piglets. *Stroke* 1996;27:1874-80; discussion 1880-1.
43. Bari, F., C. R. Thore, T. M. Louis, and D. W. Busija. Inhibitory effects of hypoxia and adenosine on N-methyl-D-aspartate-induced pial arteriolar dilation in piglets. *Brain Res* 1998;780:237-244.
44. Garlid, K. D., P. Dos Santos, Z. J. Xie, A. D. Costa, and P. Paucek. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 2003;1606:1-21.
45. Kersten, J. R., M. W. Montgomery, T. Ghassemi, E. R. Gross, W. G. Toller, P. S. Pagel, and D. C. Warltier. Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1744-50.
46. Hu, H., T. Sato, J. Seharaseyon, Y. Liu, D. C. Johns, B. O'Rourke, and E. Marban. Pharmacological and histochemical distinctions between molecularly defined sarcolemmal KATP channels and native cardiac mitochondrial KATP channels. *Mol Pharmacol* 1999;55:1000-1005.
47. Grover, G. J., A. J. D'Alonzo, K. D. Garlid, R. Bajgar, N. J. Lodge, P. G. Sleph, R. B. Darbenzio, T. A. Hess, M. A. Smith, P. Paucek, and K. S. Atwal. Pharmacologic characterization of BMS-191095, a mitochondrial K(ATP) opener with no peripheral vasodilator or cardiac action potential shortening activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1184-1192.
48. Horiguchi, T., B. Kis, N. Rajapakse, K. Shimizu, and D. W. Busija. Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2003;34:1015-1020.
49. Kis, B., K. Nagy, J. A. Snipes, N. C. Rajapakse, T. Horiguchi, G. J. Grover, and D. W. Busija. The mitochondrial K(ATP) channel opener BMS-191095 induces neuronal preconditioning. *Neuroreport* 2004;15:345-349.
50. Kis, B., N. C. Rajapakse, J. A. Snipes, K. Nagy, T. Horiguchi, and D. W. Busija. Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem* 2003;87:969-980.

51. Brini, M.  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium* 2003;34:399-405.
52. Choi, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 1995;18:58-60.
53. Halestrap, A. P. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp* 1999;66:181-203.
54. Kristian, T., and B. K. Siesjö. Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 1998;29:705-718.
55. Nicholls, D. G., S. L. Budd, M. W. Ward, and R. F. Castilho. Excitotoxicity and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 1999;66:55-67.
56. Dirnagl, U., R. P. Simon, and J. M. Hallenbeck. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;26:248-254.
57. Sato, T., and E. Marban. The role of mitochondrial  $\text{K}(\text{ATP})$  channels in cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2000;95:285-289.
58. Domoki, F., J. V. Perciaccante, R. Veltkamp, F. Bari, and D. W. Busija. Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal-vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs. *Stroke* 1999;30:2713-8; discussion 2718-9.
59. Nagy, K., B. Kis, N. C. Rajapakse, F. Bari, and D. W. Busija. Diazoxide preconditioning protects against neuronal cell death by attenuation of oxidative stress upon glutamate stimulation. *J Neurosci Res* 2004;76:697-704.
60. Nakagawa, I., H. Nakase, S. Aketa, Y. Kamada, M. Yamashita, and T. Sakaki. ATP-dependent potassium channel mediates neuroprotection by chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 2002;320:33-36.
61. Teshima, Y., M. Akao, R. A. Li, T. H. Chong, W. A. Baumgartner, M. V. Johnston, and E. Marban. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. *Stroke* 2003;34:1796-1802.

62. Yamauchi, T., S. Kashii, H. Yasuyoshi, S. Zhang, Y. Honda, and A. Akaike. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel: a novel site for neuroprotection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2750-2756.
63. Goto, K., A. Ishige, K. Sekiguchi, S. Iizuka, A. Sugimoto, M. Yuzurihara, M. Aburada, E. Hosoya, and K. Kogure. Effects of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus. *Brain Res* 1990;534:299-302.
64. Heurteaux, C., V. Bertaina, C. Widmann, and M. Lazdunski. K<sup>+</sup> channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid beta-protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:9431-9435.
65. Heurteaux, C., I. Lauritzen, C. Widmann, and M. Lazdunski. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4666-4670.
66. Veltkamp, R., F. Domoki, F. Bari, and D. W. Busija. Potassium channel activators protect the N-methyl-D-aspartate-induced cerebral vascular dilation after combined hypoxia and ischemia in piglets. *Stroke* 1998;29:837-42; discussion 842-3.
67. Liu, D., J. R. Slevin, C. Lu, S. L. Chan, M. Hansson, E. Elmer, and M. P. Mattson. Involvement of mitochondrial K<sup>+</sup> release and cellular efflux in ischemic and apoptotic neuronal death. *J Neurochem* 2003;86:966-979.
68. Reinhardt, R., A. Manaenko, A. Guenther, H. Franke, T. Dickel, S. Garcia de Arriba, G. Muench, D. Schneider, A. Wagner, and P. Illes. Early biochemical and histological alterations in rat corticoencephalic cell cultures following metabolic damage and treatment with modulators of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Neurochem Int* 2003;43:563-571.
69. Shimizu, K., N. Rajapakse, T. Horiguchi, R. M. Payne, and D. W. Busija. Neuroprotection against hypoxia-ischemia in neonatal rat brain by novel superoxide dismutase mimetics. *Neurosci Lett* 2003;346:41-44.
70. Ozcan, C., M. Bienengraeber, P. P. Dzeja, and A. Terzic. Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H531-9.



71. Dieguez, G., B. Gomez, and S. Lluch. Analysis of cerebrovascular action of diazoxide in conscious goats. *Stroke* 1980;11:372-376.
72. Wiegand, F., W. Liao, C. Busch, S. Castell, F. Knapp, U. Lindauer, D. Megow, A. Meisel, A. Redetzky, K. Ruscher, G. Trendelenburg, I. Victorov, M. Riepe, H. C. Diener, and U. Dirnagl. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1229-1237.
73. Hanley, P. J., M. Mickel, M. Loffler, U. Brandt, and J. Daut. K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J Physiol* 2002;542:735-741.
74. Garlid, K. D. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol* 2000;95:275-279.
75. Deng, X., L. Xiao, W. Lang, F. Gao, P. Ruvolo, and W. S. J. May. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* 2001;276:23681-23688.
76. Howard, S., C. Bottino, S. Brooke, E. Cheng, R. G. Giffard, and R. Sapolsky. Neuroprotective effects of bcl-2 overexpression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage. *J Neurochem* 2002;83:914-923.
77. Papadopoulos, M. C., I. L. Koumenis, L. Xu, and R. G. Giffard. Potentiation of murine astrocyte antioxidant defence by bcl-2: protection in part reflects elevated glutathione levels. *Eur J Neurosci* 1998;10:1252-1260.
78. Downey, J. M., and M. V. Cohen. Why do we still not have cardioprotective drugs? *Circ J* 2009;73:1171-1177.
79. Sato, T., N. Sasaki, J. Seharaseyon, B. O'Rourke, and E. Marban. Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection. *Circulation* 2000;101:2418-2423.
80. Forbes, R. A., C. Steenbergen, and E. Murphy. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 2001;88:802-809.
81. Ehrreich, S. J., and R. F. Furchgott. Relaxation of mammalian smooth muscles by visible and ultraviolet radiation. *Nature* 1968;218:682-684.

82. FURCHGOTT, R. F., S. J. EHRREICH, and E. GREENBLATT. The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta. *J Gen Physiol* 1961;44:499-519.
83. Cherry, P. D., R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki, and D. Jothianandan. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:2106-2110.
84. Furchgott, R. F., and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
85. Ignarro, L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga, K. S. Wood, and G. Chaudhuri. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:181-189.
86. Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9265-9269.
87. Ignarro, L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga, and K. S. Wood. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987;61:866-879.
88. Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988;12:365-372.
89. Palmer, R. M., A. G. Ferrige, and S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526.
90. Moncada, S., R. M. Palmer, and R. J. Gryglewski. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:9164-9168.
91. Forstermann, U., H. H. Schmidt, J. S. Pollock, H. Sheng, J. A. Mitchell, T. D. Warner, M. Nakane, and F. Murad. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1849-1857.

92. Mitchell, J. A., U. Forstermann, T. D. Warner, J. S. Pollock, H. H. Schmidt, M. Heller, and F. Murad. Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:1417-1423.
93. Matsunaga, K., and R. F. Furchgott. Responses of rabbit aorta to nitric oxide and superoxide generated by ultraviolet irradiation of solutions containing inorganic nitrite. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259:1140-1146.
94. Furchgott, R. F., and D. Jothianandan. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 1991;28:52-61.
95. Matsunaga, K., and R. F. Furchgott. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:687-695.
96. Venkatakrishnan, P., E. S. Nakayasu, I. C. Almeida, and R. T. Miller. Arginase activity in mitochondria--An interfering factor in nitric oxide synthase activity assays. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:448-452.
97. Tatoyan, A., and C. Giulivi. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1998;273:11044-11048.
98. Ghafourifar, P., and C. Richter. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 1997;418:291-296.
99. Sims, N. R. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J Neurochem* 1990;55:698-707.
100. Lacza, Z., J. A. Snipes, J. Zhang, E. M. Horvath, J. P. Figueroa, C. Szabo, and D. W. Busija. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med* 2003;35:1217-1228.
101. Li, G., S. Regunathan, and D. J. Reis. Agmatine is synthesized by a mitochondrial arginine decarboxylase in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 1995;763:325-329.
102. Wu, G., and S. M. J. Morris. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336:1-17.

103. Bates, T. E., A. Loesch, G. Burnstock, and J. B. Clark. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213:896-900.
104. Bates, T. E., A. Loesch, G. Burnstock, and J. B. Clark. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:40-44.
105. Hotta, Y., H. Otsuka-Murakami, M. Fujita, J. Nakagawa, M. Yajima, W. Liu, N. Ishikawa, N. Kawai, T. Masumizu, and M. Kohno. Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea pig myocardial mitochondria. *Eur J Pharmacol* 1999;380:37-48.
106. Elfering, S. L., T. M. Sarkela, and C. Giulivi. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002;277:38079-38086.
107. Giulivi, C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 2003;34:397-408.
108. Liaudet, L., F. G. Soriano, and C. Szabo. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 2000;28:N37-52.
109. Brookes, P. S., J. P. Bolanos, and S. J. Heales. The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct. *FEBS Lett* 1999;446:261-263.
110. Brown, G. C. Nitric oxide as a competitive inhibitor of oxygen consumption in the mitochondrial respiratory chain. *Acta Physiol Scand* 2000;168:667-674.
111. Pearce, L. L., A. J. Kanai, L. A. Birder, B. R. Pitt, and J. Peterson. The catabolic fate of nitric oxide: the nitric oxide oxidase and peroxynitrite reductase activities of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 2002;277:13556-13562.
112. Kojima, H., N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, and T. Nagano. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 1998;70:2446-2453.
113. Roychowdhury, S., A. Luthe, G. Keilhoff, G. Wolf, and T. F. Horn. Oxidative stress in glial cultures: detection by DAF-2 fluorescence used as a tool to measure peroxynitrite rather than nitric oxide. *Glia* 2002;38:103-114.

114. Dedkova, E. N., X. Ji, S. L. Lipsius, and L. A. Blatter. Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C406-15.
115. Lopez-Figueroa, M. O., C. Caamano, M. I. Morano, L. C. Ronn, H. Akil, and S. J. Watson. Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:129-133.
116. Lacza, Z., T. F. Horn, J. A. Snipes, J. Zhang, S. Roychowdhury, E. M. Horvath, J. P. Figueroa, M. Kollai, C. Szabo, and D. W. Busija. Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. *J Neurochem* 2004;90:942-951.
117. Zanella, B., N. Calonghi, E. Pagnotta, L. Masotti, and C. Guarnieri. Mitochondrial nitric oxide localization in H9c2 cells revealed by confocal microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1010-1014.
118. Boveris, A., S. L. Arnaiz, J. Bustamante, S. Alvarez, L. Valdez, A. D. Boveris, and A. Navarro. Pharmacological regulation of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 2002;359:328-339.
119. Ghafourifar, P., M. L. Asbury, S. S. Joshi, and E. D. Kincaid. Determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity. *Methods Enzymol* 2005;396:424-444.
120. Boveris, A., S. Alvarez, and A. Navarro. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1186-1193.
121. Boveris, A., L. B. Valdez, S. Alvarez, T. Zaobornyj, A. D. Boveris, and A. Navarro. Kidney mitochondrial nitric oxide synthase. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:265-271.
122. Alvarez, S., and A. Boveris. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1472-1478.
123. Zaobornyj, T., L. B. Valdez, P. La Padula, L. E. Costa, and A. Boveris. Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. II. mtNOS activity. *J Appl Physiol* 2005;98:2370-2375.
124. Gonzales, G. F., F. A. Chung, S. Miranda, L. B. Valdez, T. Zaobornyj, J. Bustamante, and A. Boveris. Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4,340 m). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2568-73.

125. Navarro, A., and A. Boveris. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1534-1544.
126. Zaobornyj, T., L. B. Valdez, D. E. Iglesias, M. Gasco, G. F. Gonzales, and A. Boveris. Mitochondrial nitric oxide metabolism during rat heart adaptation to high altitude: effect of sildenafil, L-NAME, and L-arginine treatments. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1741-7.
127. Navarro, A., M. J. Bandez, C. Gomez, M. G. Repetto, and A. Boveris. Effects of rotenone and pyridaben on complex I electron transfer and on mitochondrial nitric oxide synthase functional activity. *J Bioenerg Biomembr* 2010;42:405-412.
128. Nagano, T. Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* 1999;14:283-290.
129. Lacza, Z., M. Puskar, J. P. Figueroa, J. Zhang, N. Rajapakse, and D. W. Busija. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1609-1615.
130. Adak, S., K. S. Aulak, and D. J. Stuehr. Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 2002;277:16167-16171.
131. Henrich, M., K. Hoffmann, P. Konig, M. Gruss, T. Fischbach, A. Godecke, G. Hempelmann, and W. Kummer. Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria. *Mol Cell Neurosci* 2002;20:307-322.
132. Gao, S., J. Chen, S. V. Brodsky, H. Huang, S. Adler, J. H. Lee, N. Dhadwal, L. Cohen-Gould, S. S. Gross, and M. S. Goligorsky. Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria. *J Biol Chem* 2004;279:15968-15974.
133. Iwakiri, Y. S-nitrosylation of proteins: A new insight into endothelial cell function regulated by eNOS-derived NO. *Nitric Oxide* 2011;25:95-101.

134. Sun, J., M. J. Kohr, T. Nguyen, A. M. Aponte, P. S. Connelly, S. G. Esfahani, M. Gucek, M. P. Daniels, C. Steenbergen, and E. Murphy. Disruption of Caveolae Blocks Ischemic Preconditioning-Mediated S-Nitrosylation of Mitochondrial Proteins. *Antioxid Redox Signal* 2011
135. Steffen, M., T. M. Sarkela, A. A. Gybina, T. W. Steele, N. J. Trasseth, D. Kuehl, and C. Giulivi. Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem J* 2001;356:395-402.
136. Kozlov, A. V., K. Staniek, and H. Nohl. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 1999;454:127-130.
137. Nohl, H., K. Staniek, B. Sobhian, S. Bahrami, H. Redl, and A. V. Kozlov. Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. *Acta Biochim Pol* 2000;47:913-921.
138. Chen, Z., J. Zhang, and J. S. Stamler. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8306-8311.
139. Nagase, S., K. Takemura, A. Ueda, A. Hirayama, K. Aoyagi, M. Kondoh, and A. Koyama. A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:150-153.
140. Chen, M., Z. Zsengeller, C. Y. Xiao, and C. Szabo. Mitochondrial-to-nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in cardiac myocytes during oxidant stress: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cardiovasc Res* 2004;63:682-688.
141. van Wijk, S. J., and G. J. Hageman. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2005;39:81-90.
142. Yu, S. W., H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson, and V. L. Dawson. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002;297:259-263.
143. Ziegler, M., D. Jorcke, A. Herrero-Yraola, and M. Schweiger. Bovine liver mitochondrial NAD<sup>+</sup> glycohydrolase. Relationship to ADP-ribosylation and calcium fluxes. *Adv Exp Med Biol* 1997;419:443-446.



144. Jorcke, D., M. Ziegler, A. Herrero-Yraola, and M. Schweiger. Enzymic, cysteine-specific ADP-ribosylation in bovine liver mitochondria. *Biochem J* 1998;332:189-193.
145. Du, L., X. Zhang, Y. Y. Han, N. A. Burke, P. M. Kochanek, S. C. Watkins, S. H. Graham, J. A. Carcillo, C. Szabo, and R. S. Clark. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD<sup>+</sup> depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 2003;278:18426-18433.
146. Yang, Y., and J. Loscalzo. S-nitrosoprotein formation and localization in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:117-122.
147. Stamler, J. S., S. Lamas, and F. C. Fang. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001;106:675-683.
148. Gaston, B. M., J. Carver, A. Doctor, and L. A. Palmer. S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv* 2003;3:253-263.
149. Foster, M. W., D. T. Hess, and J. S. Stamler. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med* 2009;15:391-404.
150. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2002;287:2563-2569.
151. Nishikawa, T., D. Edelstein, X. L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M. A. Yorek, D. Beebe, P. J. Oates, H. P. Hammes, I. Giardino, and M. Brownlee. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-790.
152. Pieper, G. M., M. Jordan, L. A. Dondlinger, M. B. Adams, and A. M. Roza. Peroxidative stress in diabetic blood vessels. Reversal by pancreatic islet transplantation. *Diabetes* 1995;44:884-889.
153. Camara, A. K., M. Bienengraeber, and D. F. Stowe. Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury. *Front Physiol* 2011;2:13.
154. Gerbitz, K. D., K. Gempel, and D. Brdiczka. Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* 1996;45:113-126.
155. Lee, T. S., L. C. MacGregor, S. J. Fluharty, and G. L. King. Differential regulation of protein kinase C and (Na,K)-adenosine triphosphatase

- activities by elevated glucose levels in retinal capillary endothelial cells. *J Clin Invest* 1989;83:90-94.
156. Mohanty, P., W. Hamouda, R. Garg, A. Aljada, H. Ghanim, and P. Dandona. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2970-2973.
  157. Soriano, F. G., L. Virag, and C. Szabo. Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med (Berl)* 2001;79:437-448.
  158. Podesta, F., G. Romeo, W. H. Liu, S. Krajewski, J. C. Reed, C. Gerhardinger, and M. Lorenzi. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 2000;156:1025-1032.
  159. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA* 2003;290:2159-2167.
  160. Toescu, V., S. L. Nuttall, U. Martin, P. Nightingale, M. J. Kendall, P. Brydon, and F. Dunne. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2004;106:93-98.
  161. Szabo, C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol* 2009;156:713-727.
  162. Fainaru, O., B. Almog, I. Pinchuk, M. J. Kupfermanc, D. Lichtenberg, and A. Many. Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo. *BJOG* 2002;109:938-941.
  163. Myatt, L., and X. Cui. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004;122:369-382.
  164. Coughlan, M. T., P. P. Vervaart, M. Permezel, H. M. Georgiou, and G. E. Rice. Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2004;25:78-84.
  165. Raijmakers, M. T., R. Dechend, and L. Poston. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension* 2004;44:374-380.

166. Raijmakers, M. T., E. M. Roes, L. Poston, E. A. Steegers, and W. H. Peters. The transient increase of oxidative stress during normal pregnancy is higher and persists after delivery in women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;138:39-44.
167. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-820.
168. Virag, L., and C. Szabo. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002;54:375-429.
169. Pacher, P., L. Liaudet, F. G. Soriano, J. G. Mabley, E. Szabo, and C. Szabo. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes* 2002;51:514-521.
170. Zou, M. H., R. Cohen, and V. Ullrich. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium* 2004;11:89-97.
171. Seabra, A. B., E. Pankotai, M. Feher, A. Somlai, L. Kiss, L. Biro, C. Szabo, M. Kollai, M. G. de Oliveira, and Z. Lacza. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Dermatol* 2007;156:814-818.
172. Todd, P. A., K. L. Goa, and H. D. Langtry. Transdermal nitroglycerin (glyceryl trinitrate). A review of its pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 1990;40:880-902.
173. Brookes, P. S., S.-s. Sheu, and M. W. Anders. Compositions and Methods for Attenuating Mitochondria-Mediated Cell Injury.
174. Salas, E., E. J. Langford, M. T. Marrinan, J. F. Martin, S. Moncada, and A. J. de Belder. S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation and deposition in coronary artery saphenous vein grafts in vitro and in vivo. *Heart* 1998;80:146-150.
175. de Belder, A. J., R. MacAllister, M. W. Radomski, S. Moncada, and P. J. Vallance. Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res* 1994;28:691-694.
176. MacAllister, R. J., A. L. Calver, J. Riezebos, J. Collier, and P. Vallance. Relative potency and arteriovenous selectivity of nitrovasodilators on human blood

- vessels: an insight into the targeting of nitric oxide delivery. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;273:154-160.
177. Kaposzta, Z., P. A. Baskerville, D. Madge, S. Fraser, J. F. Martin, and H. S. Markus. L-arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. *Circulation* 2001;103:2371-2375.
178. Kaposzta, Z., A. Clifton, J. Molloy, J. F. Martin, and H. S. Markus. S-nitrosoglutathione reduces asymptomatic embolization after carotid angioplasty. *Circulation* 2002;106:3057-3062.
179. Molloy, J., J. F. Martin, P. A. Baskerville, S. C. Fraser, and H. S. Markus. S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. *Circulation* 1998;98:1372-1375.
180. Rassaf, T., P. Kleinbongard, M. Preik, A. Dejam, P. Gharini, T. Lauer, J. Erckenbrecht, A. Duschin, R. Schulz, G. Heusch, M. Feelisch, and M. Kelm. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical Study on the fate of NO in human blood. *Circ Res* 2002;91:470-477.
181. Lees, C., E. Langford, A. S. Brown, A. de Belder, A. Pickles, J. F. Martin, and S. Campbell. The effects of S-nitrosoglutathione on platelet activation, hypertension, and uterine and fetal Doppler in severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1996;88:14-19.
182. Langford, E. J., A. S. Brown, R. J. Wainwright, A. J. de Belder, M. R. Thomas, R. E. Smith, M. W. Radomski, J. F. Martin, and S. Moncada. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* 1994;344:1458-1460.
183. Ramsay, B., M. Radomski, A. De Belder, J. F. Martin, and P. Lopez-Jaramillo. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br J Clin Pharmacol* 1995;40:101-102.
184. Snyder, A. H., M. E. McPherson, J. F. Hunt, M. Johnson, J. S. Stamler, and B. Gaston. Acute effects of aerosolized S-nitrosoglutathione in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:922-926.
185. Langford, E. J., R. J. Wainwright, and J. F. Martin. Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:51-55.

186. Manoj M. Veleparampil, U. K. A.,<sup>1</sup> and C. T. Aravindakumar<sup>1</sup>. Decomposition of S-Nitrosothiols Induced by UV and Sunlight. *Advances in Physical Chemistry* 2009;Volume 2009:1-5.
187. Sexton, D. J., A. Muruganandam, D. J. McKenney, and B. Mutus. Visible light photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione: potential photochemotherapeutic applications. *Photochem Photobiol* 1994;59:463-467.
188. Abdel-Latif, A., R. Bolli, I. M. Tleyjeh, V. M. Montori, E. C. Perin, C. A. Hornung, E. K. Zuba-Surma, M. Al-Mallah, and B. Dawn. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167:989-997.
189. Sussman, M. A., and C. E. Murry. Bones of contention: marrow-derived cells in myocardial regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:950-953.
190. Guan, K., and G. Hasenfuss. Do stem cells in the heart truly differentiate into cardiomyocytes? *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:377-387.
191. Singla, D. K., R. D. Singla, and D. E. McDonald. Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis in H9c2 cells through PI3K/Akt but not ERK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H907-13.
192. Ishikawa, F., H. Shimazu, L. D. Shultz, M. Fukata, R. Nakamura, B. Lyons, K. Shimoda, S. Shimoda, T. Kanemaru, K. Nakamura, H. Ito, Y. Kaji, A. C. Perry, and M. Harada. Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *FASEB J* 2006;20:950-952.
193. Matsuura, K., H. Wada, T. Nagai, Y. Iijima, T. Minamino, M. Sano, H. Akazawa, J. D. Molkentin, H. Kasanuki, and I. Komuro. Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J Cell Biol* 2004;167:351-363.
194. Sato, Y., H. Araki, J. Kato, K. Nakamura, Y. Kawano, M. Kobune, T. Sato, K. Miyanishi, T. Takayama, M. Takahashi, R. Takimoto, S. Iyama, T. Matsunaga, S. Ohtani, A. Matsuura, H. Hamada, and Y. Niitsu. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756-763.

195. Gerdes, H. H., and R. N. Carvalho. Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:470-475.
196. Pontes, B., N. B. Viana, L. Campanati, M. Farina, V. M. Neto, and H. M. Nussenzveig. Structure and elastic properties of tunneling nanotubes. *Eur Biophys J* 2008;37:121-129.
197. Curriel, I. M., M. Koide, C. H. Yang, A. Segal, G. C. Wellman, and J. L. Spees. Incomplete reprogramming after fusion of human multipotent stromal cells and bronchial epithelial cells. *FASEB J* 2010;24:4856-4864.
198. Badorff, C., R. P. Brandes, R. Popp, S. Rupp, C. Urbich, A. Aicher, I. Fleming, R. Busse, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107:1024-1032.
199. Horvath, E. M., Z. Lacza, A. Csordas, C. Szabo, M. Kollai, and D. W. Busija. Graft derived cells with double nuclei in the penumbral region of experimental brain trauma. *Neurosci Lett* 2006;396:182-186.
200. Spees, J. L., S. D. Olson, M. J. Whitney, and D. J. Prockop. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1283-1288.
201. Anderson, M. F., and N. R. Sims. Improved recovery of highly enriched mitochondrial fractions from small brain tissue samples. *Brain Res Brain Res Protoc* 2000;5:95-101.
202. Sims, N. R., and M. F. Anderson. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc* 2008;3:1228-1239.
203. Hampson, R. E., J. Mu, and S. A. Deadwyler. Cannabinoid and kappa opioid receptors reduce potassium K current via activation of G(s) proteins in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 2000;84:2356-2364.
204. Mattson, M. P., Y. Zhang, and S. Bose. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. *Exp Neurol* 1993;121:1-13.

205. Latzkovits, L., H. F. Cserr, J. T. Park, C. S. Patlak, K. D. Pettigrew, and A. Rimanoczy. Effects of arginine vasopressin and atriopeptin on glial cell volume measured as 3-MG space. *Am J Physiol* 1993;264:C603-8.
206. Tropel, P., D. Noel, N. Platet, P. Legrand, A. L. Benabid, and F. Berger. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004;295:395-406.
207. Urban, V. S., J. Kiss, J. Kovacs, E. Gocza, V. Vas, E. Monostori, and F. Uher. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 2008;26:244-253.
208. Hegyi, B., B. Sagi, J. Kovacs, J. Kiss, V. S. Urban, G. Meszaros, E. Monostori, and F. Uher. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int Immunol* 2010;22:551-559.
209. Lopez, M. F., B. S. Kristal, E. Chernokalskaya, A. Lazarev, A. I. Shestopalov, A. Bogdanova, and M. Robinson. High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis* 2000;21:3427-3440.
210. Igamberdiev, A. U., N. V. Bykova, W. Ens, and R. D. Hill. Dihydrolipoamide dehydrogenase from porcine heart catalyzes NADH-dependent scavenging of nitric oxide. *FEBS Lett* 2004;568:146-150.
211. Virag, L., A. L. Salzman, and C. Szabo. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol* 1998;161:3753-3759.
212. Hecker, M., A. Mulsch, and R. Busse. Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* 1994;62:1524-1529.
213. Huang, P. L., T. M. Dawson, D. S. Brecht, S. H. Snyder, and M. C. Fishman. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993;75:1273-1286.
214. Comelli, M., F. Di Pancrazio, and I. Mavelli. Apoptosis is induced by decline of mitochondrial ATP synthesis in erythroleukemia cells. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1190-1199.



215. Wenzel, P., U. Hink, M. Oelze, S. Schuppan, K. Schaeuble, S. Schildknecht, K. K. Ho, H. Weiner, M. Bachschmid, T. Munzel, and A. Daiber. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity. Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J Biol Chem* 2007;282:792-799.
216. Wright, G., K. Terada, M. Yano, I. Sergeev, and M. Mori. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp Cell Res* 2001;263:107-117.
217. Tretter, L., and V. Adam-Vizi. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:2335-2345.
218. Tretter, L., and V. Adam-Vizi. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* 2004;24:7771-7778.
219. Schwanstecher, M., S. Loser, F. Chudziak, and U. Panten. Identification of a 38-kDa high affinity sulfonylurea-binding peptide in insulin-secreting cells and cerebral cortex. *J Biol Chem* 1994;269:17768-17771.
220. Kanai, A. J., L. L. Pearce, P. R. Clemens, L. A. Birder, M. M. VanBibber, S. Y. Choi, W. C. de Groat, and J. Peterson. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14126-14131.
221. Castello, P. R., P. S. David, T. McClure, Z. Crook, and R. O. Poyton. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab* 2006;3:277-287.
222. Guo, F. Q., and N. M. Crawford. Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 2005;17:3436-3450.
223. Zemojtel, T., M. Kolanczyk, N. Kossler, S. Stricker, R. Lurz, I. Mikula, M. Duchniewicz, M. Schuelke, P. Ghafourifar, P. Martasek, M. Vingron, and S. Mundlos. Mammalian mitochondrial nitric oxide synthase: characterization of a novel candidate. *FEBS Lett* 2006;580:455-462.

224. Csordas, A., E. Pankotai, J. A. Snipes, A. Cselenyak, Z. Sarszegi, A. Cziraki, B. Gaszner, L. Papp, R. Benko, L. Kiss, E. Kovacs, M. Kollai, C. Szabo, D. W. Busija, and Z. Lacza. Human heart mitochondria do not produce physiologically relevant quantities of nitric oxide. *Life Sci* 2007;80:633-637.
225. French, S., C. Giulivi, and R. S. Balaban. Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2863-7.
226. Lacza, Z., A. V. Kozlov, E. Pankotai, A. Csordas, G. Wolf, H. Redl, M. Kollai, C. Szabo, D. W. Busija, and T. F. Horn. Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway. *Free Radic Res* 2006;40:369-378.
227. Tischner, R., E. Planchet, and W. M. Kaiser. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett* 2004;576:151-155.
228. Lacza, Z., E. M. Horvath, E. Pankotai, A. Csordas, M. Kollai, C. Szabo, and D. W. Busija. The novel red-fluorescent probe DAR-4M measures reactive nitrogen species rather than NO. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005;52:335-340.
229. Lebuffe, G., P. T. Schumacker, Z. H. Shao, T. Anderson, H. Iwase, and T. L. Vanden Hoek. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H299-308.
230. Yamamoto, Y., M. Henrich, R. L. Snipes, and W. Kummer. Altered production of nitric oxide and reactive oxygen species in rat nodose ganglion neurons during acute hypoxia. *Brain Res* 2003;961:1-9.
231. Valdez, L. B., and A. Boveris. Mitochondrial nitric oxide synthase, a voltage-dependent enzyme, is responsible for nitric oxide diffusion to cytosol. *Front Biosci* 2007;12:1210-1219.
232. Foster, M. W., and J. S. Stamler. New insights into protein S-nitrosylation. Mitochondria as a model system. *J Biol Chem* 2004;279:25891-25897.
233. Graziani, G., and C. Szabo. Clinical perspectives of PARP inhibitors. *Pharmacol Res* 2005;52:109-118.

234. Druzhyna, N., M. E. Smulson, S. P. LeDoux, and G. L. Wilson. Poly(ADP-ribose) polymerase facilitates the repair of N-methylpurines in mitochondrial DNA. *Diabetes* 2000;49:1849-1855.
235. Yu, S. W., S. A. Andrabi, H. Wang, N. S. Kim, G. G. Poirier, T. M. Dawson, and V. L. Dawson. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18314-18319.
236. Pankotai, E., Z. Lacza, M. Muranyi, and C. Szabo. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosyl)ation: potential role for alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Mitochondrion* 2009;9:159-164.
237. Han, M. K., J. Y. Lee, Y. S. Cho, Y. M. Song, N. H. An, H. R. Kim, and U. H. Kim. Regulation of NAD<sup>+</sup> glycohydrolase activity by NAD(+)-dependent auto-ADP-ribosylation. *Biochem J* 1996;318:903-908.
238. Weng, B., W. C. Thompson, H. J. Kim, R. L. Levine, and J. Moss. Modification of the ADP-ribosyltransferase and NAD glycohydrolase activities of a mammalian transferase (ADP-ribosyltransferase 5) by auto-ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1999;274:31797-31803.
239. Ziegler, M., D. Jorcke, and M. Schweiger. Identification of bovine liver mitochondrial NAD<sup>+</sup> glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem J* 1997;326:401-405.
240. Babady, N. E., Y. P. Pang, O. Elpeleg, and G. Isaya. Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6158-6163.
241. Klyachko, N. L., V. A. Shchedrina, A. V. Efimov, S. V. Kazakov, I. G. Gazaryan, B. S. Kristal, and A. M. Brown. pH-dependent substrate preference of pig heart lipoamide dehydrogenase varies with oligomeric state: response to mitochondrial matrix acidification. *J Biol Chem* 2005;280:16106-16114.
242. Yan, L. J., S. H. Yang, H. Shu, L. Prokai, and M. J. Forster. Histochemical staining and quantification of dihydrolipoamide dehydrogenase diaphorase activity using blue native PAGE. *Electrophoresis* 2007;28:1036-1045.
243. Ying, W., Y. Chen, C. C. Alano, and R. A. Swanson. Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:774-779.

244. Gutierrez, J., S. W. Ballinger, V. M. Darley-USmar, and A. Landar. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res* 2006;99:924-932.
245. Kang, D., and N. Hamasaki. Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1281-1288.
246. Stuart, J. A., and M. F. Brown. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:79-89.
247. Veves, A., C. M. Akbari, J. Primavera, V. M. Donaghue, D. Zacharoulis, J. S. Chrzan, U. DeGirolami, F. W. LoGerfo, and R. Freeman. Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease, and foot ulceration. *Diabetes* 1998;47:457-463.
248. Georgii, J. L., T. P. Amadeu, A. B. Seabra, M. G. de Oliveira, and A. Monte-Alto-Costa. Topical S-nitrosoglutathione-releasing hydrogel improves healing of rat ischaemic wounds. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5:612-619.
249. Seabra, A. B., L. L. da Rocha, M. N. Eberlin, and M. G. de Oliveira. Solid films of blended poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl pyrrolidone) for topical S-nitrosoglutathione and nitric oxide release. *J Pharm Sci* 2005;94:994-1003.
250. Seabra, A. B., A. Fitzpatrick, J. Paul, M. G. De Oliveira, and R. Weller. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *Br J Dermatol* 2004;151:977-983.
251. Murray, J., S. W. Taylor, B. Zhang, S. S. Ghosh, and R. A. Capaldi. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem* 2003;278:37223-37230.
252. Brito, C., M. Naviliat, A. C. Tiscornia, F. Vuillier, G. Gualco, G. Dighiero, R. Radi, and A. M. Cayota. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* 1999;162:3356-3366.
253. Ferdinandy, P. Peroxynitrite: just an oxidative/nitrosative stressor or a physiological regulator as well? *Br J Pharmacol* 2006;148:1-3.

254. Low, S. Y., M. Sabetkar, K. R. Bruckdorfer, and K. M. Naseem. The role of protein nitration in the inhibition of platelet activation by peroxynitrite. *FEBS Lett* 2002;511:59-64.
255. Mondoro, T. H., B. C. Shafer, and J. G. Vostal. Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1055-1063.
256. Pacher, P., J. S. Beckman, and L. Liaudet. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
257. Tawfik, H. E., J. Cena, R. Schulz, and S. Kaufman. Role of oxidative stress in multiparity-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1736-42.
258. Heikal, L., G. P. Martin, and L. A. Dailey. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelators. *Nitric Oxide* 2009;20:157-165.
259. Manoj, V. M., H. Mohan, U. K. Aravind, and C. T. Aravindakumar. One-electron reduction of S-nitrosothiols in aqueous medium. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1240-1246.
260. Kaplan, L. D. The analysis of articular cartilage after thermal exposure: "Is red really dead?". *Arthroscopy* 2003;19:310-313.
261. Onfelt, B., M. A. Purbhoo, S. Nedvetzki, S. Sowinski, and D. M. Davis. Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubules. *Sci STKE* 2005;2005:pe55.
262. Plotnikov, E. Y., T. G. Khryapenkova, A. K. Vasileva, M. V. Marey, S. I. Galkina, N. K. Isaev, E. V. Sheval, V. Y. Polyakov, G. T. Sukhikh, and D. B. Zorov. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med* 2008;12:1622-1631.
263. Koyanagi, M., R. P. Brandes, J. Haendeler, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res* 2005;96:1039-1041.
264. Onfelt, B., S. Nedvetzki, K. Yanagi, and D. M. Davis. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 2004;173:1511-1513.

265. Menasche, P. You can't judge a book by its cover. *Circulation* 2006;113:1275-1277.
266. Fedak, P. W. Paracrine effects of cell transplantation: modifying ventricular remodeling in the failing heart. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2008;20:87-93.
267. Takahashi, M., T. S. Li, R. Suzuki, T. Kobayashi, H. Ito, Y. Ikeda, M. Matsuzaki, and K. Hamano. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H886-93.
268. Uemura, R., M. Xu, N. Ahmad, and M. Ashraf. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* 2006;98:1414-1421.
269. Dai, W., S. L. Hale, B. J. Martin, J. Q. Kuang, J. S. Dow, L. E. Wold, and R. A. Kloner. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 2005;112:214-223.
270. Kinnaird, T., E. Stabile, M. S. Burnett, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, and S. E. Epstein. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678-685.
271. Nygren, J. M., S. Jovinge, M. Breitbach, P. Sawen, W. Roll, J. Hescheler, J. Taneera, B. K. Fleischmann, and S. E. Jacobsen. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10:494-501.
272. Kajstura, J., M. Rota, B. Whang, S. Cascapera, T. Hosoda, C. Bearzi, D. Nurzynska, H. Kasahara, E. Zias, M. Bonafe, B. Nadal-Ginard, D. Torella, A. Nascimbene, F. Quaini, K. Urbanek, A. Leri, and P. Anversa. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 2005;96:127-137.
273. Garbade, J., A. Schubert, A. J. Rastan, D. Lenz, T. Walther, J. F. Gummert, S. Dhein, and F. W. Mohr. Fusion of bone marrow-derived stem cells with

- cardiomyocytes in a heterologous in vitro model. Eur J Cardiothorac Surg 2005;28:685-691.
274. Driesen, R. B., G. D. Dispersyn, F. K. Verheyen, S. M. van den Eijnde, L. Hofstra, F. Thone, P. Dijkstra, W. Debie, M. Borgers, and F. C. Ramaekers. Partial cell fusion: a newly recognized type of communication between dedifferentiating cardiomyocytes and fibroblasts. Cardiovasc Res 2005;68:37-46.
275. A. Cselenyák, E. Pankotai, A. Csordás, L. Kiss, and Lacza, Z. Live-Cell Fluorescent Imaging of Membrane or Mitochondrion Transfer between Connected Cells in Culture. In: edited by Méndez-Vilas, A., and Díaz, J. FORMATEX, 2011, 764-771.



## 8. Saját közlemények

A doktori fokozatszerzéshez szükséges szcientometriai adatok. A "sejtbiológia" témakör minimális limitjei zárójelben megadva.

Összesített impakt faktor	128,243 (60)
PhD munkában nem szereplő közlemények impakt faktora	115,807 (30)
Összes citáció	781 (240)
Független citáció	643 (240)
Első vagy utolsó szerzős közlemények impakt faktora	76,150 (40)
Első vagy utolsó szerzős közlemények összes citációja	483 (160)
Első vagy utolsó szerzős közlemények független citációja	409 (160)

### 8.1. A dolgozatban szereplő közlemények

1. Lacza, Z., M. Puskar, J. P. Figueroa, J. Zhang, N. Rajapakse, and D. W. Busija. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1609-1615.
2. Rajapakse, N., K. Shimizu, B. Kis, J. Snipes, Z. Lacza, and D. Busija. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels prevents neuronal cell death after ischemia in neonatal rats. *Neurosci Lett* 2002;327:208-212.
3. Shimizu, K., Z. Lacza, N. Rajapakse, T. Horiguchi, J. Snipes, and D. W. Busija. MitoK(ATP) opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1005-11.
4. Lacza, Z., E. M. Horvath, K. Komjati, T. Hortobagyi, C. Szabo, and D. W. Busija. PARP inhibition improves the effectiveness of neural stem cell transplantation in experimental brain trauma. *Int J Mol Med* 2003;12:153-159.
5. Lacza, Z., J. A. Snipes, B. Kis, C. Szabo, G. Grover, and D. W. Busija. Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the

- mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in the brain. *Brain Res* 2003;994:27-36.
6. Lacza, Z., E. Horvath, and D. W. Busija. Neural stem cell transplantation in cold lesion: a novel approach for the investigation of brain trauma and repair. *Brain Res Brain Res Protoc* 2003;11:145-154.
  7. Lacza, Z., J. A. Snipes, A. W. Miller, C. Szabo, G. Grover, and D. W. Busija. Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K<sup>+</sup> channels. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1339-1347.
  8. Lacza, Z., J. A. Snipes, J. Zhang, E. M. Horvath, J. P. Figueroa, C. Szabo, and D. W. Busija. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med* 2003;35:1217-1228.
  9. Lacza, Z., T. F. Horn, J. A. Snipes, J. Zhang, S. Roychowdhury, E. M. Horvath, J. P. Figueroa, M. Kollai, C. Szabo, and D. W. Busija. Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. *J Neurochem* 2004;90:942-951.
  10. Busija, D. W., Z. Lacza, N. Rajapakse, K. Shimizu, B. Kis, F. Bari, F. Domoki, and T. Horiguchi. Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels--a novel approach to neuroprotection. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;46:282-294.
  11. Lacza, Z., E. M. Horvath, E. Pankotai, A. Csordas, M. Kollai, C. Szabo, and D. W. Busija. The novel red-fluorescent probe DAR-4M measures reactive nitrogen species rather than NO. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005;52:335-340.
  12. Lacza, Z., A. V. Kozlov, E. Pankotai, A. Csordas, G. Wolf, H. Redl, M. Kollai, C. Szabo, D. W. Busija, and T. F. Horn. Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway. *Free Radic Res* 2006;40:369-378.
  13. Horvath, E. M., Z. Lacza, A. Csordas, C. Szabo, M. Kollai, and D. W. Busija. Graft derived cells with double nuclei in the penumbral region of experimental brain trauma. *Neurosci Lett* 2006;396:182-186.
  14. Lacza, Z., E. Pankotai, A. Csordas, D. Gero, L. Kiss, E. M. Horvath, M. Kollai, D. W. Busija, and C. Szabo. Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist? *Nitric Oxide* 2006;14:162-168.

15. Csordas, A., E. Pankotai, J. A. Snipes, A. Cselenyak, Z. Sarszegi, A. Cziraki, B. Gaszner, L. Papp, R. Benko, L. Kiss, E. Kovacs, M. Kollai, C. Szabo, D. W. Busija, and Z. Lacza. Human heart mitochondria do not produce physiologically relevant quantities of nitric oxide. *Life Sci* 2007;80:633-637.
16. Ihnat, M. A., J. E. Thorpe, C. D. Kamat, C. Szabo, D. E. Green, L. A. Warnke, Z. Lacza, A. Cselenyak, K. Ross, S. Shakir, L. Piconi, R. C. Kaltreider, and A. Ceriello. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia* 2007;50:1523-1531.
17. Seabra, A. B., E. Pankotai, M. Feher, A. Somlai, L. Kiss, L. Biro, C. Szabo, M. Kollai, M. G. de Oliveira, and Z. Lacza. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Dermatol* 2007;156:814-818.
18. Lacza, Z., E. Pankotai, and D. W. Busija. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front Biosci* 2009;14:4436-4443.
19. Pankotai, E., Z. Lacza, M. Muranyi, and C. Szabo. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosyl)ation: potential role for alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Mitochondrion* 2009;9:159-164.
20. Horvath, E. M., R. Magenheimer, E. Kugler, G. Vacz, A. Szigethy, F. Levardi, M. Kollai, C. Szabo, and Z. Lacza. Nitrative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in healthy and gestational diabetic pregnancies. *Diabetologia* 2009;52:1935-1943.
21. Cselenyak, A., E. Pankotai, E. M. Horvath, L. Kiss, and Z. Lacza. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol* 2010;11:29.
22. Hornyak, I., L. Kiss, K. Fekete, E. Pankotai, and Z. Lacza. Az S-Nitrozoglutation nitrogénmonoxid-donor molekula terápiás alkalmazásának lehetőségei. *Érbetegségek* 2010;17:55-59.
23. A. Cselenyák, E. Pankotai, A. Csordás, L. Kiss, and Lacza, Z. Live-Cell Fluorescent Imaging of Membrane or Mitochondrion Transfer between Connected Cells in Culture. In: edited by Méndez-Vilas, A., and Díaz, J. FORMATEX, 2011, 764-771.

24. Hornyak, I., E. Pankotai, L. Kiss, and Z. Lacza. Current Developments in the Therapeutic Potential of S-Nitrosoglutathione, an Endogenous NO-donor Molecule. Curr Pharm Biotechnol 2011

## 8.2. Egyéb közlemények

1. Benyo, Z., Z. Lacza, C. Gorlach, and M. Wahl. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase fails to alter the resting tension and the relaxant effect of bradykinin in isolated rat middle cerebral arteries. Acta Physiol Hung 1999;86:161-165.
2. Benyo, Z., Z. Lacza, T. Hortobagyi, C. Gorlach, and M. Wahl. Functional importance of neuronal nitric oxide synthase in the endothelium of rat basilar arteries. Brain Res 2000;877:79-84.
3. Lacza, Z., B. Erdos, C. Gorlach, M. Wahl, P. Sandor, and Z. Benyo. The cerebrocortical microcirculatory effect of nitric oxide synthase blockade is dependent upon baseline red blood cell flow in the rat. Neurosci Lett 2000;291:65-68.
4. Lacza, Z., K. Kaldi, K. Kovacs, C. Gorlach, Z. Nagy, P. Sandor, Z. Benyo, and M. Wahl. Involvement of prostanoid release in the mediation of UTP-induced cerebrovascular contraction in the rat. Brain Res 2001;896:169-174.
5. Lacza, Z., P. Herman, C. Gorlach, T. Hortobagyi, P. Sandor, M. Wahl, and Z. Benyo. NO synthase blockade induces chaotic cerebral vasomotion via activation of thromboxane receptors. Stroke 2001;32:2609-2614.
6. Lacza, Z., M. Puskar, B. Kis, J. V. Perciaccante, A. W. Miller, and D. W. Busija. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;283:H406-11.
7. Hortobagyi, T., C. Gorlach, Z. Benyo, Z. Lacza, S. Hortobagyi, M. Wahl, and T. Harkany. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase-mediated activation of poly(ADP-ribose) polymerase in traumatic brain injury: neuroprotection by 3-aminobenzamide. Neuroscience 2003;121:983-990.
8. Erdos, B., Z. Lacza, I. E. Toth, E. Szelke, T. Mersich, K. Komjati, M. Palkovits, and P. Sandor. Mechanisms of pain-induced local cerebral blood flow

- changes in the rat sensory cortex and thalamus. *Brain Res* 2003;960:219-227.
9. Lacza, Z., L. Dezső, K. Kaldi, E. M. Horvath, P. Sandor, and Z. Benyó. Prostacyclin-mediated compensatory mechanism in the coronary circulation during acute NO synthase blockade. *Life Sci* 2003;73:1141-1149.
  10. Simandle, S. A., B. A. Kerr, Z. Lacza, D. M. Eckman, D. W. Busija, and F. Bari. Piglet pial arteries respond to N-methyl-D-aspartate in vivo but not in vitro. *Microvasc Res* 2005;70:76-83.
  11. Kiss, L., M. Chen, D. Gero, K. Modis, Z. Lacza, and C. Szabo. Effects of 7-ketocholesterol on the activity of endothelial poly(ADP-ribose) polymerase and on endothelium-dependent relaxant function. *Int J Mol Med* 2006;18:1113-1117.
  12. Molnar, A., A. Toth, Z. Bagi, Z. Papp, I. Edes, M. Vaszily, Z. Galajda, J. G. Papp, A. Varro, V. Szuts, Z. Lacza, D. Gero, and C. Szabo. Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. *Mol Med* 2006;12:143-152.
  13. Lacza, Z., and D. W. Busija. Urotensin-II is a nitric oxide-dependent vasodilator in the pial arteries of the newborn pig. *Life Sci* 2006;78:2763-2766.
  14. Toth-Zsamboki, E., E. Horvath, K. Vargova, E. Pankotai, K. Murthy, Z. Zsengeller, T. Barany, T. Pek, K. Fekete, R. G. Kiss, I. Preda, Z. Lacza, D. Gero, and C. Szabo. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol Med* 2006;12:221-228.
  15. Mersich, T., E. Szelke, B. Erdos, Z. Lacza, K. Komjati, and P. Sandor. Somatosensory pain does not affect total cerebral blood volume. *Neuroreport* 2007;18:649-652.
  16. Lacza, Z., L. Hortobágyi, B. Horvath, E. M. Horvath, P. Sandor, and Z. Benyó. Additive effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase blockade on the cerebrocortical microcirculation. *Neuroreport* 2009;20:1027-1031.
  17. Horvath, B., G. Lenzser, B. Benyó, T. Nemeth, R. Benko, A. Iring, P. Herman, K. Komjati, Z. Lacza, P. Sandor, and Z. Benyó. Hypersensitivity to

- thromboxane receptor mediated cerebral vasomotion and CBF oscillations during acute NO-deficiency in rats. PLoS One 2010;5:e14477.
18. Buday, A., P. Orsy, M. Godo, M. Mozes, G. Kokeny, Z. Lacza, A. Koller, Z. Ungvari, M. L. Gross, Z. Benyo, and P. Hamar. Elevated systemic TGF-beta impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE(-/-) mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;299:H386-95.
  19. Aberg, J., E. Pankotai, G. Hulsart Billstrom, M. Wessl, S. Larsson, C. Forster-Horvath, Z. Lacza, and H. Engqvist. In vivo evaluation of an injectable premixed radiopaque calcium phosphate cement. Int J Biomater 2011;2011:232574.
  20. Horvathy, D. B., P. P. Nardai, T. Major, K. Schandl, A. Cselenyak, G. Vacz, L. Kiss, M. Szendroi, and Z. Lacza. Muscle regeneration is undisturbed by repeated polytraumatic injury. Eur J Trauma Emerg Surg 2011;37:161-167.
  21. Schwirtlich, M., A. Kwakowsky, Z. Emri, K. Antal, Z. Lacza, A. Cselenyak, Z. Katarova, and G. Szabo. GABAergic signaling in primary lens epithelial and lentoid cells and its involvement in intracellular Ca(2+) modulation. Cell Calcium 2011
  22. Kiss, L., R. Benko, E. Kovacs, T. Szerafin, K. Modis, C. Szabo, and Z. Lacza. Human internal thoracic artery grafts exhibit severe morphological and functional damage and spasmic vasomotion due to oxidative stress. Med Sci Monit 2011;17:CR411-6.
  23. Kiraly, M., K. Kadar, D. B. Horvathy, P. Nardai, G. Z. Racz, Z. Lacza, G. Varga, and G. Gerber. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. Neurochem Int 2011;59:371-381.

### 8.3. Szabadalmak

1. Lacza, Z., and I. Hornyák. Pharmaceutical composition comprising S-nitrosoglutathione and polysaccharide. 2010, US 20100292326
2. Lacza, Z., and M. Wessl. Method for producing an implantable bone composition. 2010, US 20100303885

3. Lacza, Z., and I. Hornyák. Method for stabilization of S-nitrosoglutathione and composition prepared by the same. 2011, US 20110136910
4. Lacza, Z., M. Wenzl, and V. Izápy. Imaging chamber for supporting multiple investigation of cells and tissues by various techniques. 2011, PCT/HU2011/000003
5. Lacza, Z., M. Wenzl, and V. Izápy. Device for centrifugation and further processing of tissue aspirates in closed system. 2011, PCT/HU2011/000002
6. Lacza, Z., and I. Hornyák. Method for colorimetric determination of cPNMP specific enzyme activity via coupled enzymatic reactions. 2011, EP 11462003.2
7. Horváthy, D. B., G. Váczi, and Z. Lacza. Protein coated bioactive suture for cell transplantation and method for producing thereof. 2011, US 61/526,727

#### 8.4. Könyvfejezetek

1. Sándor, P., Komjáti, K., de Jong, W., Erdős, B., Lacza, Z., Benyó, Z., and Reivich, M. Hemorrhage-induced brain ischaemia: Modulatory role of endogenous opioids and antioioids in the cerebrovascular bed. In: Ischemic blood flow in the brain, edited by Fukuuchi, Y, Tomita, M., and Koto, A. Springer-Verlag, Tokyo, 2000,
2. Benyo, Z., Z. Lacza, T. Hortobagyi, C. Gorlach, and M. Wahl. Functional importance of neuronal nitric oxide synthase in the endothelium of rat basilar arteries. Brain Res 2000;877:79-84.
3. Sándor, P., Benyó, Z., Erdős, B., Lacza, Z., and Komjáti, K. The Roy-Sherrington hypothesis: facts and surmises. In: International Congress Series 1235, edited by 2002, 325-335.
4. Lacza, Z. Technológia Transzfer a Semmelweis Egyetemen. In: Innovációmenedzsment, edited by Pörzse, G. Semmelweis Kiadó, 2009,
5. A. Cselenyák, E. Pankotai, A. Csordás, L. Kiss, and Lacza, Z. Live-Cell Fluorescent Imaging of Membrane or Mitochondrion Transfer between

Connected Cells in Culture. In: edited by Méndez-Vilas, A., and Díaz, J. FORMATEX, 2011, 764-771.

6. Lacza, Z., and Weszli, M., Business from IP. Semmelweis Innovations, 2011.

### 8.5. Magyar nyelvű közlemények

1. Zador, Z., Z. Lacza, Z. Benyo, T. Harkany, and T. Hortobagyi. [Apoptosis in focal brain ischemia]. Ideggyogy Sz 2003;56:216-228.
2. Zador, Z., Z. Benyo, Z. Lacza, T. S. Hortobagyi, T. Harkany, and T. Hortobagyi. [Neuroprotection in brain ischemia--doubts and hopes]. Ideggyogy Sz 2004;57:81-93.
3. Csordas, A., and Z. Lacza. Őssejtek és regenerációs orvostudomány. Praxis 2005
4. Muranyi, M., and Z. Lacza. [Influence of diabetes mellitus on cerebral ischemia and reperfusion injury]. Orv Hetil 2006;147:1885-1889.
5. Muranyi, M., and Z. Lacza. [Astrocytes in health and disease]. Orv Hetil 2007;148:697-702.
6. Hornyak, I., L. Kiss, K. Fekete, E. Pankotai, and Z. Lacza. Az S-Nitrozoglutation nitrogénmonoxid-donor molekula terápiás alkalmazásának lehetőségei. Érbetegségek 2010;17:55-59.
7. Kiss, L., R. Benkő, E. Kovács, T. Szerafin, K. Módos, C. Szabó, and Z. Lacza. Humán arteria thoracica interna graftok morfológiai és funkcionális vizsgálata. Érbetegségek 2010;17:9-15.
8. Kiss, L., E. Dongó, Z. Janicsek, M. Szepes, Z. Benkő, A. Cselenyak, and Z. Lacza. Őssejtterápia alkalmazásának eredményei perifériás érbetegségben. Érbetegségek 2010;17:33-38.
9. Cselenyak, A., Z. Benkő, M. Szepes, E. Horváth, Z. Lacza, and L. Kiss. Az őssejtek szerepe a szívinfarktus kezelésében: in vitro kísérletes módszer a hatásmechanizmus vizsgálatára. Érbetegségek 2011;18:3-11.



## 9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindazon tanároknak, akik szakmai tudása és biztatása indított el majd tartott meg ezen a pályán. Gimnáziumban Dr. Berend Mihály biológia szakköre és Dr. Csaba György fizika tanítása ismertette meg velem a természettudományok alapjait. Az egyetemi évek alatt a tudományos diákköri vezetőim, Prof. Sándor Péter és Prof. Benyó Zoltán voltak azok, akik iránymutatása mellett megtanultam kísérletezni. Külföldön sokat tanultam Prof. David Busija vezetése alatt nemcsak tudományos munkában, hanem munkaszervezés, kutatócsoport építés tekintetében is, amelyért igen hálás vagyok. Hazatérésem után Prof. Kollai Márk és Dr. Szabó Csaba adott lehetőséget arra, hogy önálló kutatócsoportot alapítsak, támogatásuk nélkül a külföldön elindított kutatások nem tudtak volna itthon hasznosulni. Köszönettel tartozom Prof. Tulassay Tivadar rektor úrnak is, mivel megbízott az egyetemi technológia transzfer iroda megszervezésével, és ennek kapcsán tudtam az alapkutatási eredményeket egy lépéssel tovább vinni a hasznosítás, klinikai bevezetés felé. Prof. Szendrői Miklós javaslatára indultam el a tudomány és klinikum együttes pályáján, mentorálása nélkül nem tudtam volna hazai körülmények között kutatóorvosként dolgozni. Köszönettel tartozom PhD és TDK hallgatóimnak, akik szorgalma, szakma iránti elkötelezettsége és szorgalma elengedhetetlenül szükséges volt az eredmények elérésében.

Hálás vagyok feleségemnek, Ildikónak a türelméért és támogatásáért, amely átsegített a tudományos munka kudarcos időszakain. Hasonlóképpen köszönettel tartozom szüleimnek és testvéremnek, akik biztatása nélkül el sem indultam volna a tudományos kutatás útján.